

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
FERNANDA MARIA MARINS OCAMPOS

ESTUDO FITOQUÍMICO, TOXICOLÓGICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE VEGETAL *Sapium glandulosum* (L.) Morong.  
(EUPHORBIACEAE)

CURITIBA  
2013

FERNANDA MARIA MARINS OCAMPOS

ESTUDO FITOQUÍMICO, TOXICOLÓGICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE VEGETAL *Sapium glandulosum* (L.) Morong.  
(EUPHORBIACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos, Linha de Pesquisa em Produtos Naturais, do Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA  
2013

Ocampos, Fernanda Maria Marins

Estudo fitoquímico, toxicológico e avaliação das atividades da espécie vegetal *Sapium glandulosum* (L.) Morong. (EUPHORBIACEAE) / Fernanda Maria Marins Ocampos – Curitiba, 2013.

100 f. : il. color. ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Obdúlio Gomes Miguel

Coorientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2013.

Inclui bibliografia

1. *Sapium glandulosum*. 2. Fitoquímica. 3. Quercetina. 4. Ácido elágico. 5. Rutina. I. Miguel, Obdúlio Gomes. II. Miguel, Marilis Dallarmi. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.32

# TERMO DE APROVAÇÃO

FERNANDA MARIA MARINS OCAMPOS

Título: ESTUDO FITOQUÍMICO, TOXICOLÓGICO E  
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE  
VEGETAL *Sapium glandulosum* (L.)  
Morong.(EUPHORBIACEAE)

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.

  
Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel  
Orientador

  
Profa. Dra. Sandra Mara Woranovicz Barreira  
Universidade Federal do Paraná

  
Dra. Cristiane Hatsuko Baggio  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 1 de março de 2013.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**.

Aos meus pais, **Nívea** e **Guillermo**, ao meu irmão **Guillermo** e à minha avó **Elfi** pelo apoio, incentivo, dedicação, compreensão, carinho e amor incondicionais.

Aos **amigos** pelos bons momentos e apoio e companheirismo nas horas vagas.

À **Universidade Federal do Paraná** e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** pela oportunidade.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel** pelos ensinamentos, dedicação, confiança, paciência, e amizade.

À minha co-orientadora **Prof<sup>a</sup> Dra. Marilis Dallarmi Miguel** pelos ensinamentos, revisão do trabalho e amizade.

Ao curador do museu botânico **Osmar dos Santos Ribas** pelas informações e identificação do exemplar da espécie em estudo.

Ao doutorando **Vinícius** pelos espectros de ressonância magnética nuclear, pelas sugestões e amizade.

Ao **Laboratório de RMN do departamento de Química da UFPR** pelos espectros de ressonância magnética nuclear.

Ao **Prof. Dr. Andersson Barison**, do Departamento de Química da UFPR, pelos ensinamentos, contribuição e dedicação na análise dos espectros de ressonância magnética nuclear.

Às colegas de mestrado **Daniella, Thais, Luciane, Maria Fernanda, Mariana, Ana Flávia** e **Juliana** pela contribuição, amizade e companheirismo durante as atividades.

Aos doutorandos, **Milena, Beatriz, Cristiane Paula, Cristiane Bezerra e Ranieri** pelo companheirismo, apoio e sugestões.

A todos os colegas de mestrado e doutorado pela amizade.

Ao **Núcleo de Pesquisa Clínica Cardiocare**, em especial à **Angela Koide** e **Dra. Viviana Lemke**, pelo apoio e compreensão durante esta etapa.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que fez tua rosa tão importante*

Antoine de Saint-Exupéry

## RESUMO

A planta *Sapium glandulosum* (L.) Morong., foi escolhida para o presente estudo por apresentar poucos estudos científicos. Foram realizados os estudos fitoquímicos e de atividades biológicas das folhas e cascas da planta. Pertencente à família Euphorbiaceae, *Sapium glandulosum* (L.) Morong. é uma árvore latescente, também popularmente conhecida como leiteiro, pau de leite, burra leiteira, janaguba, seringarana, entre outros. A análise fitoquímica foi realizada, iniciando-se pelo ensaio fitoquímico sistemático, com o objetivo de se fazer uma triagem dos componentes fitoquímicos presentes na planta. Os dados obtidos corroboraram com as substâncias químicas posteriormente isoladas e identificadas, uma vez que foram encontrados um flavonóide e duas moléculas precursoras dos taninos hidrolisáveis classificados como elagitaninos. A quercetina, o flavonóide isolado, tem a estrutura já descrita na literatura. As moléculas precursoras dos taninos hidrolisáveis foram identificadas como o ácido elágico e seu derivado, o 3,3'-di-*o*-metil ácido elágico, ambos já descritos na literatura. A atividade antioxidante das frações e extratos foi analisada por três diferentes métodos. No método da inibição da peroxidação lipídica foram obtidos bons resultados para as amostras da folha e para a fração hexano da casca, que se mostraram superiores ao padrão BHT. A análise da inibição do radical DPPH não mostrou atividade antioxidante significativa para as frações em relação aos padrões rutina e vitamina C. A análise da formação do complexo fosfomolibdênico apresentou resultado significativo para a fração acetato de etila da casca, que apresentou resultados estatisticamente iguais ao do padrão rutina. A atividade tóxica das frações e extratos sobre o micro crustáceo *Artemia salina* foi testada para os extratos brutos de folhas e cascas e suas respectivas frações e não apresentou toxicidade. A atividade hemolítica das frações e extratos foi testada por dois métodos e os resultados obtidos foram negativos, ou seja, os extratos não produziram hemólise. Os resultados obtidos são importantes, pois o conhecimento obtido pode, com estudos adicionais, beneficiar a sociedade através do uso seguro da planta pelos seres humanos.

Palavras-chave: *Sapium glandulosum*. Fitoquímica. Quercetina. Ácido elágico. Rutina.

## ABSTRACT

The plant *Sapium glandulosum* (L.) Morong., was chosen for this study because few scientific studies about it has been made. Phytochemical Studies were performed and biological activities of the leaves and bark of the plant have been tested. Belonging to the family Euphorbiaceae, *Sapium glandulosum* (L.) Morong. is a milky tree, also popularly known as leiteiro, pau de leite, burra leiteira, janaguba, seringarana, among others. The phytochemical analysis was performed, starting at phytochemical systematic testing, with the goal of doing a screening of phytochemical constituents present in the plant. The obtained data corroborated with chemical substances isolated and identified subsequently, a flavonoid and two molecules precursors of hydrolysable tannins classified as ellagitannins. Quercetin, the isolated flavonoid, has the structure already described in literature. The precursor molecules of hydrolysable tannins have been identified as ellagic acid and its derivative, 3,3'-di-o-methyl ellagic acid, both are described in the literature. The antioxidant activity of extracts and fractions was analyzed by three different methods. In the method of inhibition of lipid peroxidation good results were obtained for all the leaf samples and for bark hexane fraction, which were superior to standard BHT. Analysis of inhibition of DPPH showed no significant antioxidant activity for the fractions in relation to the standards rutin and vitamin C. The analysis of formation of phosphomolybdenum complex showed significant results for the ethyl acetate fraction of the bark, which showed results statistically identical to the rutin standard. The toxic activity of extracts and fractions on *Artemia salina* was tested for crude extracts of leaves and bark and their fractions and showed no toxicity. The hemolytic activity of fractions and extracts was tested by two methods and the results were negative, that is, the extracts produced no haemolysis. Os resultados obtidos são importantes, pois o conhecimento obtido pode, com estudos adicionais, beneficiar a sociedade através do uso seguro da planta pelos seres humanos.

Key words: *Sapium glandulosum*. Phytochemistry. Quercetin. Ellagic acid. Rutin.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO GÁLICO E HHDP .....	21
FIGURA 2 -	SUBSTÂNCIAS ENCONTRADAS EM <i>Sapium insigne</i> (ROYLE) BENTH. ex HOOK. fil. ....	25
FIGURA 3 -	MAPA DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE NO BRASIL .....	26
FIGURA 4 -	FOTO DE EXEMPLAR DA ESPÉCIE .....	28
FIGURA 5 -	ESTRUTURA DO NÚCLEO FUNDAMENTAL DE UM FLAVONÓIDE .....	30
FIGURA 6 -	FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA EMPREGADA .....	33
FIGURA 7 -	EXSICATA DE <i>Sapium glandulosum</i> , ACERVO N <sup>o</sup> 332898 .....	34
FIGURA 8 -	PARTES AÉREAS DE <i>Sapium glandulosum</i> .....	35
FIGURA 9 -	PARTES AÉREAS DA PLANTA COLETADA <i>Sapium</i> <i>glandulosum</i> .....	35
FIGURA 10 -	APARELHO DE SOXHLET .....	48
FIGURA 11 -	COLUNA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO .....	51
FIGURA 12 -	FRASCOS OBTIDOS APÓS A REALIZAÇÃO DE CROMATOGRAFIA EM COLUNA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA .....	51
FIGURA 13 -	ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H DA SUBSTÂNCIA FOCAM4 (400MHz, DMSO -d6) .....	70
FIGURA 14 -	ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DA SUBSTÂNCIA FOCAM4 (200MHz, DMSO -d6) .....	71
FIGURA 15 -	ESPECTRO DE HSQC DA SUBSTÂNCIA FOCAM4 (400MHz, DMSO -d6) .....	72
FIGURA 16 -	APROXIMAÇÃO DOS HIDROGÊNIOS DO ANEL A NO ESPECTRO DE HSQC DE FOCAM4 (400MHz, DMSO -d6) .....	72
FIGURA 17 -	APROXIMAÇÃO DOS HIDROGÊNIOS DO ANEL B NO ESPECTRO DE HSQC DE FOCAM4 (400MHz, DMSO -d6) .....	72
FIGURA 18 -	ESPECTRO DE HMBC DE FOCAM4 (400MHz, DMSO -d6) .....	73
FIGURA 19 -	ESTRUTURA MOLECULAR DO FLAVONÓIDE QUERCETINA .....	73
FIGURA 20 -	ESPECTRO DE RMN- <sup>1</sup> H DA AMOSTRA FOCAM5 (400MHz, DMSO -d6, 40 °C) .....	75
FIGURA 21 -	ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA AMOSTRA FOCAM5 (200MHz, DMSO -d6) .....	76
FIGURA 22 -	ESPECTRO DE HSQC OBTIDO APÓS ANÁLISE DA AMOSTRA FOCAM5 (400MHz, DMSO -d6, 40 °C) .....	77
FIGURA 23 -	RECORTE DO ESPECTRO DE HSQC DE FOCAM5 INDICANDO AS CORRELAÇÕES DIRETAS DOS HIDROGÊNIOS AROMÁTICOS (400MHz, DMSO -d6, 40 °C) .....	77

FIGURA 24 - APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HSQC, MOSTRANDO A CORRELAÇÃO DIRETA DOS HIDROGÊNIOS CH <sub>2</sub> (400MHz, DMSO –d <sub>6</sub> , 40 °C) .....	78
FIGURA 25 - ESPECTRO DE HMBC PARA A MISTURA FOCAM5 (400MHz, DMSO –d <sub>6</sub> , 40 °C) .....	78
FIGURA 26 - APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HMBC, INDICANDO AS CORRELAÇÕES PARA DOIS HIDROGÊNIOS AROMÁTICOS DA MISTURA FOCAM5 (400MHz, DMSO –d <sub>6</sub> , 40 °C).....	79
FIGURA 27 - APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HMBC, INDICANDO AS CORRELAÇÕES PARA O HIDROGÊNIO AROMÁTICO EM MENOR QUANTIDADE DA MISTURA FOCAM5 (400MHz, DMSO –d <sub>6</sub> , 40 °C) .....	79
FIGURA 28 - CORRELAÇÕES A LONGA DISTÂNCIA DOS CH <sub>2</sub> PRESENTES NA AMOSTRA FOCAM5 (400MHz, DMSO –d <sub>6</sub> , 40 °C).....	80
FIGURA 29 - APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HMBC DE FOCAM5, INDICANDO A CORRELAÇÃO À LONGA DISTANCIA DO HIDROGÊNIO DA METOXILA (400MHz, DMSO –d <sub>6</sub> , 40 °C).....	80
FIGURA 30 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO ELÁGICO .....	81
FIGURA 31 - ESTRUTURA QUÍMICA DO 3,3'-DI-O-METIL ÁCIDO ELÁGICO.....	82
FIGURA 32 - TESTE DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA POR DIFUSÃO EM ÁGAR.....	91

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA EM RELAÇÃO AOS PADRÕES .....	85
GRÁFICO 2 -INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (TBARS) (%) DAS AMOSTRAS E PADRÕESTESTADOS.....	86
GRÁFICO 3 -CURVA DA REDUÇÃO DE DPPH EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS PADRÕES E AMOSTRAS .....	88
GRÁFICO 4 -RELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE AMOSTRA E A IC50 .....	89

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE SAPIUM GLANDULOSUM (L.) MORONG SEGUNDO CRONQUIST .....	18
QUADRO 2 - TUBOS A SEREM PREPARADOS PARA O TESTE DE ALCALÓIDES .....	40
QUADRO 3 - EXTRATOS E FRAÇÕES SECAS (3MG/ML) .....	54
QUADRO 4 - SOLUÇÕES PARA TESTE PRELIMINAR. ....	58
QUADRO 5 - PROCEDIMENTO PARA OCORRÊNCIA DE HEMÓLISE .....	58
QUADRO 6 - SOLUÇÕES PARA TESTE PRINCIPAL .....	59
QUADRO 7 - RESULTADOS DA MARCHA FITOQUÍMICA COM AS FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO .....	63
QUADRO 8 - RESULTADOS DA MARCHA FITOQUÍMICA COM O EXTRATO AQUOSO .....	65

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - UMIDADE (%) DA FOLHA .....	61
TABELA 2 - CINZAS TOTAIS (%) DO MATERIAL COLETADO .....	62
TABELA 3 - PESO SECO DOS EXTRATOS BRUTOS DAS PARTES DE SAPIUM GLANDULOSUM.....	66
TABELA 4 - PESO DAS FRAÇÕES .....	67
TABELA 5 - COMPARAÇÃO ENTRE SINAIS DE RMN 13C E 1H DE FOCAM4 E LITERATURA .....	74
TABELA 6 - COMPARAÇÃO ENTRE SINAIS DE RMN 13C E 1H DE FOCAM5S2 E LITERATURA.....	81
TABELA 7 - COMPARAÇÃO ENTRE SINAIS DE RMN 13C E 1H DE FOCAM5S2 E LITERATURA.....	82
TABELA 8 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS EM RELAÇÃO AOS PADRÕES.....	84
TABELA 9 - RESULTADO DE CI50 E DESVIO PADRÃO PARA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH .....	87
TABELA 10 - MORTALIDADE DE ARTEMIA SALINA E DL50 .....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CCD	- Cromatografia de Camada Delgada
CV	- Coeficiente de variação
DEPT	- Distortion-less Enhancement by Polarization Transfer
DP	- Desvio padrão
DPR	- Desvio padrão relativo
EABC	- Extrato Alcoólico Bruto Casca
EABF	- Extrato Alcoólico Bruto Folha
FAC	- Fração Acetato de Etila Casca
FAF	- Fração Acetato de Etila Folha
FCC	- Fração Clorofórmio Casca
FCF	- Fração Clorofórmio Folha
FHAC	- Fração Hidroalcoólica Casca
FHAF	- Fração Hidroalcoólica Folha
FHC	- Fração Hexano Casca
FHF	- Fração Hexano Folha
HMBC	- Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	- High performanced liquid chromatography
HSQC	- Heteronuclear Single Quantum Correlation
l/l	- Líquido-líquido
s/l	- Sólido-líquido

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1 OBJETIVO GERAL	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>18</b>
2.1 <i>Sapium glandulosum</i> (L.) Morong	18
2.1.1 Taxonomia	18
2.1.2 Sinônimos e nomes populares	24
2.1.3 Distribuição geográfica	26
2.1.4 Descrição macroscópica	27
2.1.5 Uso popular	28
2.1.6 Composição química e atividades biológicas	29
2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA	29
2.2.1 Flavonóides	30
2.2.2 Taninos	31
2.3 O ESTUDO DE <i>Sapium glandulosum</i>	32
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
3.1 MATERIAL VEGETAL	34
3.1.1 Coleta, Identificação e exsiccata	34
3.2 ESTUDOS FITOQUÍMICOS	36
3.2.1 Análises físico-químicas	36
3.2.2 Ensaio sistemático fitoquímico	37
3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	47
3.3.1 Extração por Soxhlet	47
3.3.2 Análises físico-químicas	49
3.4 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES	49
3.4.1 Sistema de partição líquido - líquido	49
3.4.2 Determinação do teor de sólidos	50
3.5 PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS	50
3.6 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	52
3.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	52
3.7.1 Formação do complexo fosfomolibdênico	52
3.7.2 Teste com espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)	53
3.7.3 Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	54
3.8 ANÁLISE DA ATIVIDADE SOBRE <i>Artemia salina</i>	55
3.8.1 Preparo da solução salina	55
3.8.2 Eclosão dos cistos	55
3.8.3 Preparo das amostras	56
3.8.4 Avaliação da toxicidade	56
3.9 ATIVIDADE HEMOLÍTICA	57
3.9.1 Atividade hemolítica por difusão em Agar	57
3.9.2 Atividade hemolítica em sangue de carneiro	57
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>61</b>

4.1 QUANTIDADE DE MATERIAL COLETADO .....	61
4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA PLANTA .....	61
4.2.1 Umidade .....	61
4.2.2 Cinzas totais .....	62
4.3 ENSAIO SISTEMÁTICO FITOQUÍMICO.....	62
4.4 RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS POR SOXHLET .....	66
4.5 FRAÇÕES OBTIDAS PELO SISTEMA DE PARTIÇÃO LÍQUIDO- LÍQUIDO.....	66
4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS .....	67
4.6.1 O isolado FOCAM1 .....	68
4.6.2 O isolado FOCAM2 .....	68
4.6.3 O isolado FOCAM3 .....	69
4.6.4 O isolado FOCAM4 .....	69
4.6.5 O isolado FOCAM5 .....	74
4.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	83
4.7.1 Formação do complexo fosfomolibdênico .....	83
4.7.2 Teste com espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	85
4.7.3 Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH (2,2- difênil-1-picrilhidrazila) .....	87
4.8 ANÁLISE DA ATIVIDADE SOBRE Artemia salina .....	90
4.9 ANÁLISE DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	91
4.9.1 Atividade Hemolítica por difusão em ágar .....	91
4.9.2 Atividade Hemolítica em sangue de Carneiro.....	92
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>93</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O uso das plantas pelo homem é historicamente ligado com a sobrevivência deste no planeta. As plantas vêm sendo utilizadas pelas civilizações como alimento, medicamento e inclusive como agentes tóxicos (DEVienne, RADDI, POZETTI, 2004). No Brasil, o uso das plantas medicinais foi impulsionado, principalmente, pela cultura indígena.

O uso popular, mesmo que empiricamente, deu margem à observação dos efeitos das plantas na saúde da população e, muitas vezes, instigou cientistas a comprovar as atividades farmacológicas (DEVienne, RADDI, POZETTI, 2004).

O grande interesse no estudo das plantas para sua utilização como medicamentos fitoterápicos é devido ao fácil acesso que a população pode ter a este tipo de produto, além do custo reduzido geralmente a eles associado. A comprovação científica das atividades farmacológicas das plantas pode, por este motivo, melhorar a qualidade de vida da população brasileira e mundial. A manutenção da saúde e a cura de doenças está relacionada com a exploração racional de fontes naturais. Para tal, é necessária uma política consciente de educação, ciência, tecnologia e inovação, que envolva a preservação da natureza para alcançar o desenvolvimento sustentável do país (BRAZ, 2010).

Considerando a grande biodiversidade nacional e a busca de novos fármacos de origem vegetal, com aplicação nas áreas de medicamentos, alimentos funcionais e cosméticos, desponta a fitoquímica como ciência corresponsável em alavancar o Brasil no cenário de inovação e propriedade industrial química e farmacêutica.

Nesta perspectiva, por meio da fitoquímica, busca-se desenvolver o metaboloma, que consiste na análise dos metabólitos primários (relacionado com as substâncias envolvidas nas funções básicas essenciais à vida celular) e dos metabólitos secundários - específicos das espécies- que estão envolvidos em reações intra e intercelulares, seja com células próprias ou com células de demais organismos (BRAZ, 2010).

As plantas superiores podem ser consideradas como uma das principais fontes de novas substâncias utilizadas na medicina. Podem, ainda, ser utilizadas

como molde para a criação de novas estruturas moleculares ou para modificação de estruturas moleculares já conhecidas, a fim de otimizar a atividade farmacológica de interesse (BRAZ, 2010).

Muitas vezes, o termo fitoterápico está vinculado ao termo saudável e, ainda, à ausência de efeitos colaterais. Por isto, ressalta-se a importância dos estudos toxicológicos, também necessários para comprovar a segurança das plantas utilizadas popularmente (SOUZA; ET AL, 2008).

Com o avanço da tecnologia passou a haver um interesse maior da população por medicamentos à base de plantas, agora em formas farmacêuticas mais elaboradas como, por exemplo, as cápsulas (SOUZA; ET AL, 2008).

É de grande importância o estudo multidisciplinar das plantas medicinais para poder conceber um medicamento seguro e eficaz no final do processo. Deve-se partir da etnofarmacologia, seguir com estudos de química orgânica e fitoquímica, realizar a investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados e, ainda, com estudos sobre química orgânica sintética, para com a química medicinal farmacêutica determinar a relação estrutura/ atividade e elucidar os mecanismos de ação dos princípios ativos. Finalmente pode-se realizar a operação de formulações para a produção de medicamentos a partir da pesquisa de produtos naturais (MACIEL, PINTO, VEIGA, GRYNBERG, ECHEVARRIA, 2002).

A diversidade da flora brasileira é grande. Porém existem, ainda, poucos estudos sobre as plantas que a compõem. Há uma grande necessidade de estudos fitoquímicos e das atividades biológicas das plantas brasileiras para conhecer mais sobre as possíveis aplicações das mesmas. Toda esta biodiversidade brasileira pode e deve ser aproveitada e eticamente explorada, aproveitando toda a estrutura tecnológica disponível nas universidades e institutos de pesquisa do país (FUNARI; FERRO, 2005). A planta *Sapium glandulosum* (L.) Morong. foi escolhida para o presente estudo, já que não apresenta estudos nestas áreas.

O acesso à *Sapium glandulosum* para realizar o presente estudo é fácil, já que a planta está, também, presente no estado do Paraná. As partes da planta utilizadas no estudo serão as folhas e a casca. Foram realizados estudos fitoquímicos e de atividades biológicas da planta.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Devido ao interesse na busca de metabólitos secundários com atividade biológica e à pequena quantidade de estudos relacionados à *Sapium glandulosum*, no presente trabalho foi realizado o estudo fitoquímico e das atividades biológicas da planta, visando contribuir com o conhecimento sobre a espécie.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar de componentes fitoquímicos.
- Analisar a atividade antioxidante das frações e extratos.
- Analisar a atividade tóxica das frações e extratos sobre o microcrustáceo *Artemia salina*.
- Analisar da atividade hemolítica das frações e extratos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Sapium glandulosum* (L.) Morong

Pertencente à família Euphorbiaceae, *Sapium glandulosum* (L.) Morong. é uma árvore latescente (CORDEIRO; SECCO; PSCHEIDT, 2010). Segundo literatura, a planta floresce de outubro até dezembro no estado de Santa Catarina (SMITH, DOWNS, KLEIN, 1988).

#### 2.1.1 Taxonomia

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Rosidae
Ordem	Euphorbiales
Família	Euphorbiaceae
Gênero	<i>Sapium</i>
Espécie	<i>Sapium glandulosum</i>

QUADRO 1 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE *Sapium glandulosum* (L.) MORONG  
SEGUNDO CRONQUIST  
FONTE: SMITH, DOWNS, KLEIN (1988)

As famílias Pandaceae, Thymelaceae e Euphorbiaceae compõem a ordem Euphorbiales (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002).

### 2.1.1.1 Família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae, também conhecida como a família da mandioca, foi descrita por Antoine Laurent de Jussieu e é composta por cerca de 313 gêneros e 8100 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais e sub-tropicais da América e da África, muitas das quais já demonstraram possuir alguma atividade farmacológica (OLIVEIRA, GIMENEZ, GODOY, 2007; CONEGERO *ET AL*, 2003; SCHVARTSMAN, 1979; DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002; SMITH; DOWNS; KLEIN, 1988).

Esta família possui hábito variado, crescendo em matas, cerrados, campos, pântanos e em alagados. Podem ser ervas, arbustos, subarbustos, árvores, cipós e trepadeiras, sendo que algumas crescem rasteiras e outras são altaneiras. Possuem folhas alternas, inteiras ou partidas, sendo que algumas são latescentes. As flores são de sexo separado, monóicas ou dióicas, em regra actinomorfas, sendo que se reúnem em inflorescências tipo cacho. O fruto é seco, capsular. As sementes, com ou sem carúncula, são ricas em endosperma, oleaginoso em sua maioria (OLIVEIRA, GIMENEZ, GODOY, 2007; CONEGERO *ET AL*, 2003; SCHVARTSMAN, 1979; DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002; SMITH; DOWNS; KLEIN, 1988).

No Brasil, ocorrem 72 gêneros e aproximadamente 1100 espécies (CONEGERO *ET AL*, 2003). A família Euphorbiaceae possui grandes implicações econômicas, principalmente na indústria madeireira e farmacêutica (SCHVARTSMAN, 1979; DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002).

Entre os gêneros de maior relevância podem ser citados *Ricinus* (da mamona), *Euphorbia* (com espécies ornamentais, geralmente causadoras de irritação ocular), *Hevea* (da seringueira), *Phyllanthus*, *Mabea*, *Pedilanthus*, *Jatropha* e *Croton*, os cinco últimos de interesse medicinal. Muitos gêneros pertencentes a tal família possuem seiva leitosa. Desta característica derivam as denominações populares de plantas leiteiras, pau-de-leite, cipó-de-leite. Porém, estas denominações podem também ser utilizadas para outras espécies de diferentes famílias que não a Euphorbiaceae. A presença de látex está geralmente relacionada à atribuição popular de venenosas às plantas com esta característica. Em

contrapartida, vale lembrar que substâncias tóxicas podem estar presentes não apenas no látex como também nas sementes, no óleo da semente, na entrecasca, nas folhas e nas raízes. Estas substâncias podem ser classificadas como alcalóides, proteínas e sais minerais (SCHVARTSMAN, 1979; DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002).

Dentre os usos medicinais das plantas desta família podem ser citados alguns. O chá das folhas da mandioca, *Manihot esculenta*, é utilizado para coceira no corpo. O gênero *Jatropha*, de nome popular Mertiolate, é utilizado na cicatrização de feridas. O quebra-pedra, do gênero *Phyllanthus*, é utilizado na forma de chá para dor na bexiga e rins (FUCK, *et al*, 2005).

Muitas espécies da família são tóxicas para os seres humanos e para outros animais. Registros do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto demonstram que ocorre uma parcela significativa (22%) de intoxicações com plantas da família, mas estes dados mostram também a ausência de registros de casos graves relacionados a coma ou a óbitos. Dentre elas, podem ser citadas o pinhão-paraguaio (*Jatropha curcas* L), a mamona (*Ricinus communis* L.) e a coroa-de-cristo (*Euphorbia milii* Des Moul.). Os principais casos de intoxicações foram registrados em crianças entre 3 e 14 anos de idade, do sexo masculino. No caso do pinhão-paraguaio o éster do forbol 12-deoxi-16-hidroforbol foi identificado como substância tóxica, cuja ação parece ser a geradora de resposta inflamatória dos tecidos da mucosa gastrointestinal após a ingestão de sementes. Os sintomas elencados são vômitos, diarreia, dor abdominal e náuseas. Uma substância tóxica da mamona, também presente nas sementes, é a ricina, uma proteína que inativa ribossomos eucarióticos de modo específico e irreversível. Esta inativação leva à morte celular pela incapacidade da célula de realizar a síntese protéica. Dentre os sintomas relacionados à ingestão de sementes de mamona estão perda de apetite, náuseas, vômito e diarreia. A coroa-de-cristo tem as substâncias tóxicas presentes no látex, e são elas os ésteres de forbol, que causam reações inflamatórias teciduais. Há relatos de casos freqüentes relacionados ao contato do látex com a pele. Os principais sintomas são vermelhidão, inchaço, dor e necrose tecidual (OLIVEIRA; GIMENEZ, GODOY, 2007; SCHVARTSMAN, 1979).

O gênero *Euphorbia* spp. (Spurge) é composto por mais de 1000 plantas e abrange desde ervas até árvores. Todas elas contêm um látex que é exsudado quando a planta sofre algum tipo de dano. Este látex é fortemente irritante e frequentemente é vesicante produz emese e purgação ao ser ingerido. Estes efeitos

são atribuídos a um princípio ácido que se acredita estar presente no látex da resina. Algumas espécies também contêm compostos cianogênicos. Uma das espécies tóxicas mais conhecidas desse gênero é a *Euphorbia pulcherrima* Willd., a comum Poinsettia, muito utilizada decorativamente em períodos natalinos devido às suas folhas vermelhas semelhantes a pétalas de flores (CLAUS, TYLER, BRADY, 1970).

Da espécie *Euphorbia splendens* foi isolada a lactona macrocíclica lasiodiplodina, com potente atividade antileucêmica (BRAZ, 2010).

Taninos hidrolisáveis foram encontrados em *Euphorbia thymifolia*, uma planta utilizada popularmente no sudeste da Ásia para tratar transtornos abdominais e problemas de pele. Em Taiwan, a planta é utilizada como laxante e diurética. Entre os taninos encontrados estão o 2,3-di-O-galoil-D-glucose, 3-O-galoil-4,6-(S)-HHDP-D-glucose e o 2,3-(S)-4,4',5,5',6,6'- hexahidroxidifenil (HHDP)-D-glucose. Estes compostos possuem na sua estrutura o ácido gálico e o HHDP (ácido hexahidroxidifênico), que são moléculas presente nas estruturas de galotaninos e elagitaninos. Na figura 1 estão demonstradas as estruturas do ácido gálico e HHDP (ácido hexahidroxidifênico) (LEE, *et al*, 1990).

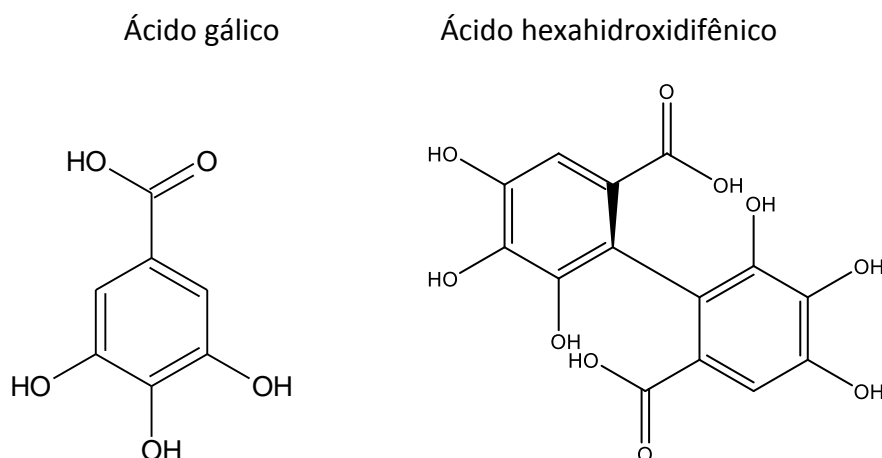


FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO GÁLICO E HHDP  
FONTE: A autora (2013)

A atividade larvívora dos óleos essenciais obtidos de caule e folhas de *Croton argyrophyllodes* (marmeleiro prateado), *Croton nepetaefolius* (marmeleiro sabiá), *Croton sonderianus* (marmeleiro preto) e *Croton zehntneri* (canela de cunha) foram avaliadas contra larvas do mosquito *Aedes aegypti* e apresentou sucesso para as quatro espécies, com variações interespecíficas e, também, pelas diferentes partes das plantas testadas (LIMA, MAIA, SOUZA, MORAIS, FREITAS, 2006).

Espécies do gênero *Alchornea* são popularmente utilizadas como agentes antidiarréicos, antiinflamatórios, antirreumáticos, antileprosos e no tratamento de doenças cutâneas. Alguns estudos farmacológicos relatam atividades antibacteriana, antiinflamatória, antiespasmódica, antitripanossômica e antidiarréica, além de citotoxicidade contra algumas linhagens de células cancerosas. No extrato metanólico das folhas da árvore *Alchornea glandulosa* (amor seco) foi encontrada uma mistura de esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol, o terpenóide liliolida com ação repelente, inibidora de germinação, imunossupressora e citotóxica contra carcinoma humano de nasofaringe e leucemia linfóide, o alcalóide guanidínico N-1, N-2, N-3-triisopentenilguanidina (potenciais agentes anticancerígenos) e o composto fenólico corilagina. As atividades antimicrobiana e antiproliferativa contra fungos e bactérias também foram testadas, além da atividade contra algumas linhagens de células cancerígenas, mostrando atividade moderada para a maioria dos testes (CONEGERO ET AL, 2003).

#### 2.1.1.2 O gênero *Sapium* P. Browne.

O gênero *Sapium* pertence à família Euphorbiaceae e é formado, principalmente, por espécies neotropicais, as quais podem ser encontradas em toda a extensão do país. São geralmente conhecidas popularmente como leiteiras e possuem, ainda, diversos outros nomes regionais. Em referência ao suco, *Sapium* provém do céltico *sap*, que significa viscoso (SCHVARTSMAN, 1979; VALLE, KAPLAN, 2000; SMITH, DOWNS, KLEIN, 1988). Estas plantas são utilizadas pela população do estado de Pernambuco como veneno (ALBUQUERQUE, ANDRADE, 2002).

Segundo estudo realizado na região da caatinga, espécies do gênero podem encontrar-se em risco de extinção, segundo caririzeiros, apesar de não aparecerem na lista do IBAMA. Isto ocorre, pois a madeira destas espécies é bastante utilizada (TROVÃO, SILVA, SILVA, VIEIRA, 2004).

As flores são monóicas, e raramente dióicas. Não possuem pétalas. O cálice masculino é pequeno, lobulado ou dentado. Os estames podem ser livres ou



miudamente soldados à base, em cima do cálice. O cálice feminino, partido ou tubuloso e dentado, é raras vezes lobulado (SMITH, DOWNS, KLEIN, 1988).

As sementes são duras ou incluídas em uma camada carnosa, sem carúncula. Os cotilédones são largos e planos (SMITH, DOWNS, KLEIN, 1988).

O látex produzido pelas espécies desse gênero possui propriedades tóxicas, cáusticas e irritantes. O contato do látex com a pele e mucosas pode provocar irritações cutâneas, com produção de prurido, dor e edema. As sementes possuem efeito purgativo e causam dores abdominais. O tratamento usual para tais ocorrências é apenas sintomático, pelo uso de antiespasmódicos e pomadas (SCHVARTSMAN, 1979).

São arbustos ou árvores, com folhas alternas, raras vezes falso-opostas, simples e muitas vezes glandulosas. Os pecíolos podem ser biglandulosos no ápice. Espigas terminais e laterais, raras vezes axilares, em regra a maior parte masculina com poucas flores femininas na base. Brácteas biglandulosas na base, pequenas, largas, as masculinas com muitas flores. São mais de cem espécies, naturais da América (SMITH, DOWNS, KLEIN, 1988).

*Sapium lanceolatum* Huber, também conhecida como murupita, entre outras espécies do gênero, é utilizada popularmente para produção de visgo para caçar passarinhos (SCHVARTSMAN, 1979; ARBELAEZ, 1990).

*Sapium haematospermium* Muell. Arg., é conhecida como mata-ratos, fruta-de-cachorro, curupicaia, curupi, entre outros nomes e possui efeito tóxico (SCHVARTSMAN, 1979).

Duas espécies do gênero *Sapium* foram pesquisadas, a fim de reduzir as controvérsias na sua classificação. As espécies participantes do estudo foram *Sapium glandulatum* (Vell.) e *Sapium sellowianum* (Mull. Arg.). Foram, ainda neste estudo, realizados extratos das ceras epicuticulares, avaliados mensalmente, por dezoito meses. A variabilidade das ceras das folhas e conteúdo de água, bem como taninos condensados e compostos fenólicos totais foram estimados e correlacionados com os dados meteorológicos. Nas ceras epicuticulares foram encontrados n-hidrocarbonetos, preferencialmente com diferentes números de cadeias de carbono, utilizadas para diferenciar as espécies de *Sapium*. Em *Sapium glandulatum*, tanto das florestas como da restinga, foram encontradas cadeias de hidrocarbonetos C<sub>27</sub> e C<sub>29</sub>. A pesquisa de óleos essenciais não obteve sucesso para ambas as plantas. O perfil cromatográfico demonstrou a presença de forbolester

(TPA). Estudos preliminares para as atividades anti-inflamatória e analgésica obtiveram bons resultados. A planta demonstrou ter propriedades tóxicas e ser irritante para a pele (VALLE, KAPLAN, 2000).

Existem registros do uso de *Sapium macrocarpum* Muell para eliminação de verrugas (GRAHAM, QUINN, FABRICANT, FARNSWORTH, 2000).

*Sapium argutum* (Müll. Arg.) Huber e *Sapium sellowianum* (Müll. Arg.) são utilizados popularmente utilizadas como abortivas e purgativas. O uso externo é também feito contra úlceras (AGRA, FREITAS, BARBOSA, 2007).

Folhas de *Sapium ellipticum* apresentaram atividade citotóxica superior a 50% a 500 µg/mL, contra a linhagem celular HeLa (adenocarcinoma de cérvix), sugerindo sua possível utilização na terapia contra o câncer (SOWEMIMO, VAN DE VENTER, BAATJIES, KOEKEMOER, 2009).

No Nepal, o suco das cascas *Sapium insigne* (ROYLE) BENTH. ex HOOK. fil. é utilizado para curar feridas e o látex leitoso é mesclado com água e utilizado para indigestão. Desta espécie foram isolados os seguintes compostos, cujas estruturas estão dispostas na figura 2: 3-O-cafeoil- ácido quínico (1), 1-O-galoil-b -D-glucose (2), 1,3-di-O-galoil-b -D-glucose (3), 16-hidroxiforbol-16-acetato (4), 4b-desoxi-16-hidroforbol-16-acetato (5), rutina (6), 1,3,4,6-tetra-Ogaloil-b-D-glucose (7), quercetina (8), guaijaverin (9) nicotiflorin (10), scopolina (11), metil galato (12), , corilagin (13) e 1,3,6-tri-O-galoil-b -D-glucose (14).

*Sapium insigne* também foi pesquisada na Índia e um triterpeno, o 3-O-acetlcicloano-23- en-25-Ol foi isolado (SRIVASTAVA, AGNIHOTRI, 1985).

De *Sapium japonicum* foi isolado o (R)-(-)-metil 8-hidroxi-5,6-octadienoato, que possui propriedade antifúngica, também encontrada na planta (HARUSAWA, ET AL, 1995).

### 2.1.2 Sinônimos e nomes populares

Abaixo estão listados alguns sinônimos de *Sapium glandulosum* (L.) Morong (CORDEIRO, SECCO, PSCHIEDT, 2010):

*Sapium aubletianum* (Müll.Arg.) Huber

*Stillingia aucuparia* (Jacq.) Oken

*Sapium aucuparium* Jacq.

*Stillingia biglandulosa* (L.) Baill.

*Sapium biglandulosum* (L.) Müll.Arg.

*Sapium claussonianum* (Müll.Arg.) Huber

*Sapium cremostachyum* (Baill.) I.M.Johnst.

*Omphalea glandulata* Vell.

*Sapium glandulatum* (Vell.) Pax

*Sapium klotzchianum* (Müll.Arg.) Huber

*Sapium marginatum* var. *lanceolatum* Müll.Arg.

*Sapium marginatum* Müll.Arg.

*Sapium occidentale* (Müll.Arg.) Huber

*Sapium haemospermum* var. *saltense* O'Donell & Lourteig

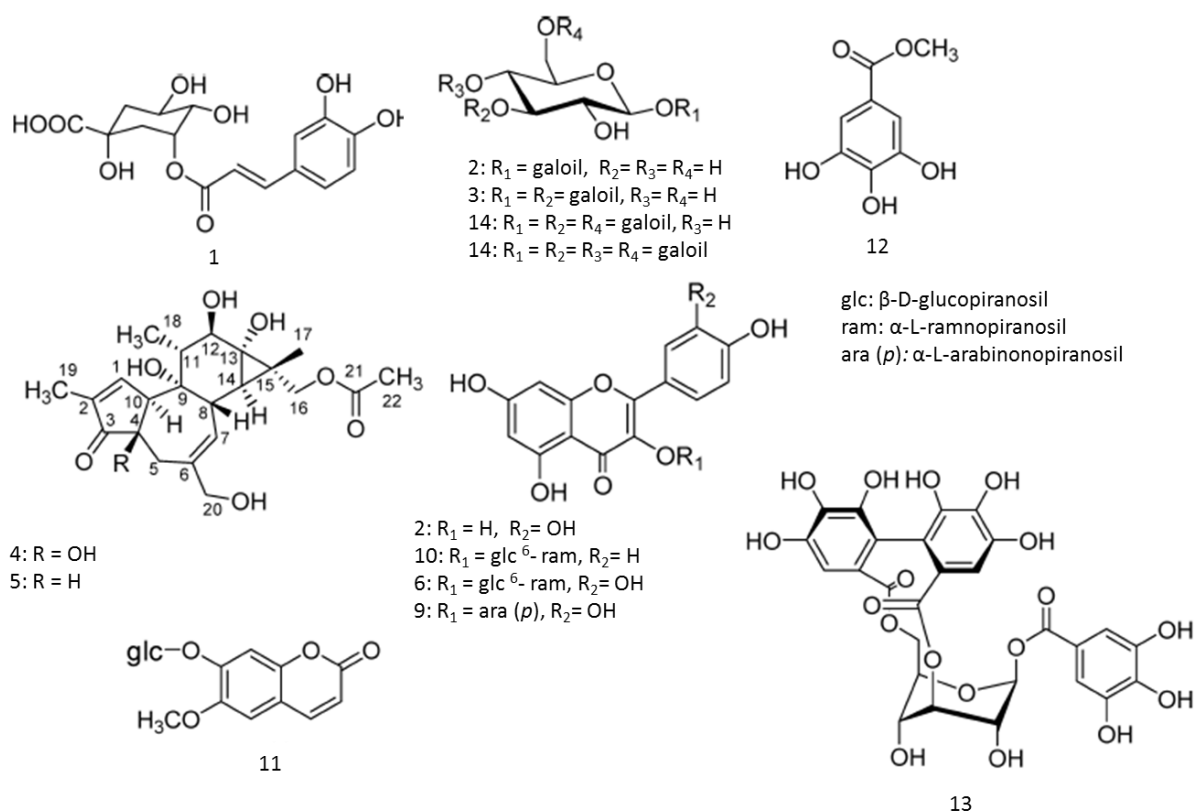


FIGURA 2 - SUBSTÂNCIAS ENCONTRADAS EM *Sapium insigne* (ROYLE) BENTH. ex HOOK. fil.

FONTE: DEVKOTA, BASNET, YAHARA (2009)

*Sapium glandulosum* é também popularmente conhecida popularmente como leiteiro, pau de leite, burra leiteira, janaguba, seringarana, mata-olho, pela-

cavalo, pau-branquilho, leiteiro de folha graúda, toropi, figueirinha, tapuru, entre outros (CORDEIRO, SECCO, PSCHIEDT, 2010).

Em guarani, é também chamada de Kurupi e kurupika'y (SCHWIROWSKI, 2010).

### 2.1.3 Distribuição geográfica

Trata-se de uma árvore nativa, característica e preferencial das florestas Ombrófilas mistas do planalto meridional Sul do Brasil, é encontrada nas regiões Norte (Roraima, Amapá, Pará, Amazonas, Tocantins, Acre, Rondônia), Nordeste (Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Sergipe), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro), e Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) do Brasil, conforme mostra a figura 1, em que os estados coloridos indicam a presença da espécie. E está presente nos domínios fitogeográficos amazônia, caatinga, cerrado e mata atlântica, ou seja, em quatro dos cinco principais biomas do país (CORDEIRO, SECCO, PSCHIEDT, 2010). É uma espécie heliófita de luz difusa e seletiva higrófito (SMITH, DOWNS, KLEIN, 1988).



FIGURA 3 - MAPA DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE NO BRASIL  
FONTE: CORDEIRO, SECCO, PSCHIEDT (2010)

#### 2.1.4 Descrição macroscópica

Arbusto ou árvore com altura entre dois e dezoito metros e com 30 a 50 centímetros de diâmetro a um metro de altura. O tronco é cilíndrico, reto ou um pouco tortuoso, com nós. A casca externa é cinzenta, ligeiramente esbranquiçada. A casca interna tem coloração creme ou marfim, com textura fibrosa e látex branco abundante, que escorre do ferimento das cascas e pelo contato com o ar coagula-se formando uma matéria escura, viscosa e elástica, de odor desagradável. A madeira branca ou levemente amarelada é de corte macio e de tecido frouxo. A copa alongada possui folhagem verde oliva que se adensa para o ápice dos ramos. Os pecíolos são delgados, com medidas entre 1 e 3 centímetros e possuem duas glândulas alongadas. A ocorrência destas glândulas explica o nome da espécie *Sapium glandulosum*, apesar de não serem exclusiva. Folhas são variáveis, mas oblongo-lanceoladas, e medem entre seis e quatorze centímetros de comprimento. As margens das folhas são inteiras ou muito irregularmente e dispersamente glanduloso-dentadas. Possui espigas terminais com poucas flores na base, algumas vezes todas masculinas, entre sete e quinze centímetros. O ovário é ocular. Os estiletes são soldados em uma coluna, por cima do cálice (SMITH, DOWNS, KLEIN, 1988).

A avaliação das glândulas do pecíolo e das glândulas das margens da lamina foliar, cujo formato é subcônico, mostrou que elas possuem um orifício no ápice, que comunica o meio externo com o interno através de um canal central. Ambas as glândulas são constituídas por tecido secretor não secretor. O primeiro é composto por epiderme em paliçada e parênquima, ambos com secreção acidófila no citoplasma de suas células. As glândulas peciolares possuem parênquima secretor com entre três a sete camadas de células. A vascularização é feita por um único feixe vascular. As glândulas marginais constam de duas a quatro camadas celulares e a vascularização se dá por três feixes vasculares (DEMARCO, CASTRO, 2002).



FIGURA 4 – FOTO DE EXEMPLAR DA ESPÉCIE  
FONTE: CÁRCAMO E CARRERE (2006)

#### 2.1.5 Uso popular

Há registros no museu Botânico de Curitiba do uso da seiva de *Sapium glandulosum* para tratamento de verrugas.

O nome popular mata-olho é devido à irritação ocular causada pelo contato do látex com os olhos. Esta inflamação é grave, provavelmente pelo látex ser viscoso, grudento e insolúvel (SCHWIROWSKI, 2010; SMITH, DOWNS, KLEIN, 1988).

A madeira é utilizada para lenha e carvão, enquanto que do látex da planta pode ser fabricada borracha de boa qualidade (SMITH, DOWNS, KLEIN, 1988).

Os índios guaranis utilizam talos e folhas carbonizadas de *Sapium glandulosum*, misturados com marcadores de própolis de uma colmeia, para ornamentar seus artesanatos e cestarias com desenhos de cor negra (KELLER, 2010).

Um estudo realizado na Costa Rica mostrou que nesta região a planta não possui usos e que, frequentemente árvores desta e de outras espécies de baixo valor econômico são cortadas pelo homem. O estudo revelou que moradores da região muitas vezes optam por manter a vegetação apenas para atrair aos pássaros (HARVEY, HABER, 1999).

#### 2.1.6 Composição química e atividades biológicas

O conteúdo de fenóis totais, taninos e flavonóides das cascas e folhas planta foi avaliado, porém não foram encontrados taninos na casca. A atividade antioxidante pelo método DPPH foi também testada, e os resultados foram uma baixa atividade antioxidante obtida (SILVA, *et. al.*, 2011).

Extratos etanólicos de folhas e cascas de *Sapium glandulosum* foram testados microbiologicamente e demonstraram atividade contra cepas *S. aureus* e *S. coagulase* negativa e as folhas mostraram-se ativas contra *E. faecalis*. Porém, quando realizado o teste de Concentração Inibitória Mínima, os resultados foram negativos para todas as cepas testadas. O mesmo estudo analisou os constituintes fitoquímicos por métodos de cromatografia em camada delgada. As classes de metabólitos encontrados nas folhas e cascas foram flavonóides, lignanas, monoterpenos, taninos condensados, mas não hidrolisáveis, e derivados antracênicos. Nas folhas foi, também detectada a presença de triterpenos, esteroides e antocianinas, enquanto que nas cascas foi observada a presença de cumarinas (SILVA, *et. al.*, 2012).

### 2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

### 2.2.1 Flavonóides

São metabólitos secundários do metabolismo das plantas e existem em relativa abundância na natureza. São polifenóis, sintetizados pela via dos fenilpropanóides. São formados a partir da união das vias metabólicas do acetil CoA e do ácido chiquímico. (SIMÕES, *ET AL.*, 2000)

São substâncias abundantes nas angiospermas e apresentam uma grande diversidade estrutural. O núcleo fundamental é formado, basicamente, por 15 carbonos. O núcleo fundamental dos flavonoides encontra-se ilustrado na figura a seguir:

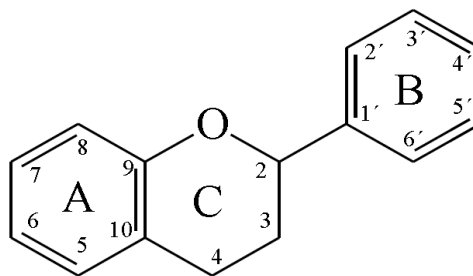


FIGURA 5 - ESTRUTURA DO NÚCLEO FUNDAMENTAL DE UM FLAVONÓIDE  
FONTE: SIMÕES, M.C.O., *ET AL.* (2000)

Os flavonóides podem ser encontrados na natureza na forma de heterosídeos, ou seja, ligados a um açúcar.

Entre as funções importantes dos flavonoides na natureza, podemos citar a proteção contra raios ultravioleta e visível; podem atrair agentes polinizadores; podem ser antimicrobianos, antifúngicos, antivirais e inseticidas, função esta diretamente relacionada com a proteção e sobrevivência da planta; são antioxidantes; controlam a ação de hormônios vegetais; inibem enzimas e são agentes alelopáticos (SIMÕES, M.C.O., *ET AL.*, 2000).

Os flavonoides são classificados em (SIMÕES, M.C.O., *ET AL.*, 2000):

- Flavonas, flavonóis e seus o-heterosídeos
- Flavonoides c-heterosídeos
- Antocianos
- Chalconas
- Auronas



- Di-hidroflavonoides
- Flavanas, leucoantocianidinas e proantocianidinas
- Isoflavonóides
- Neoflavonóides
- Biflavonóides

Frequentemente são utilizados como marcadores taxonômicos. Enquanto que, economicamente, são substâncias de grande interesse, pois são responsáveis pela pigmentação das plantas, sendo coloridos. Farmacologicamente, podem ser anticarcinogênicos, antiinflamatórios, antialérgicos, antivirais, antiulcerogênicos, entre demais atividades descritas na literatura. (SIMÕES, M.C.O., *ET AL.*, 2000)

### 2.2.2 Taninos

Taninos são substâncias conhecidas pela adstringência de frutos ou vegetais. Estas substâncias complexam-se com proteínas, sendo utilizadas para controle de insetos, fungos e bactérias. Existem dois tipos de taninos, os hidrolisáveis e os condensados (SIMÕES, M.C.O., *ET AL.*, 2000). Muitos taninos são glicosídeos (EVANS, 1989).

Estruturalmente, os taninos hidrolisáveis são compostos por um poliol em que as hidroxilas são esterificadas com ácido gálico. Taninos hidrolisáveis podem ser galotaninos ou elagitaninos. Em geral, a massa molecular é alta, indo de 500 a 5000 (SIMÕES, M.C.O., *ET AL.*, 2000; EVANS, 1989).

Moléculas menores, como ácido gálico, catequinas e ácido clorogênico, são chamadas de pseudo taninos, visto que são apenas precursores dos mesmos.

Plantas que contém taninos são utilizadas para moléstias como diarreia, reumatismo, hipertensão arterial, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, renais e processos inflamatórios (SIMÕES, M.C.O., *ET AL.*, 2000).

Testes *in vitro* demonstram que esta classe de substancias pode ser bactericida, fungicida, antitumoral, moluscida e antiviral. Tais atividades são devidas às propriedades antioxidante e sequestradora de radicais livres, à capacidade de

complexação com íons metálicos, proteínas e polissacarídeos (SIMÕES, M.C.O., *ET AL.*, 2000).

Industrialmente, os taninos são utilizados no curtimento do couro. Além disso, são componentes que contribuem com o sabor adstringente de vinhos, sucos e outras bebidas (SIMÕES, M.C.O., *ET AL.*, 2000).

Na natureza, tais substâncias são produzidas pelo metabolismo secundário de algumas plantas. Sua função está ligada à proteção e defesa química dos vegetais, em caso de ataque de animais e microorganismos patogênicos (SIMÕES, M.C.O., *ET AL.*, 2000).

### 2.3 O ESTUDO DE *Sapium glandulosum*

A partir dos dados encontrados na literatura, pode-se observar que o estudo desta planta é importante por se tratar de um exemplar da família Euphorbiaceae ainda pouco estudado. Com base nos estudos encontrados sobre plantas do gênero *Sapium* pode-se confirmar a presença dos metabólitos secundários taninos e flavonóides.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado de acordo com o fluxograma demonstrado na figura abaixo.

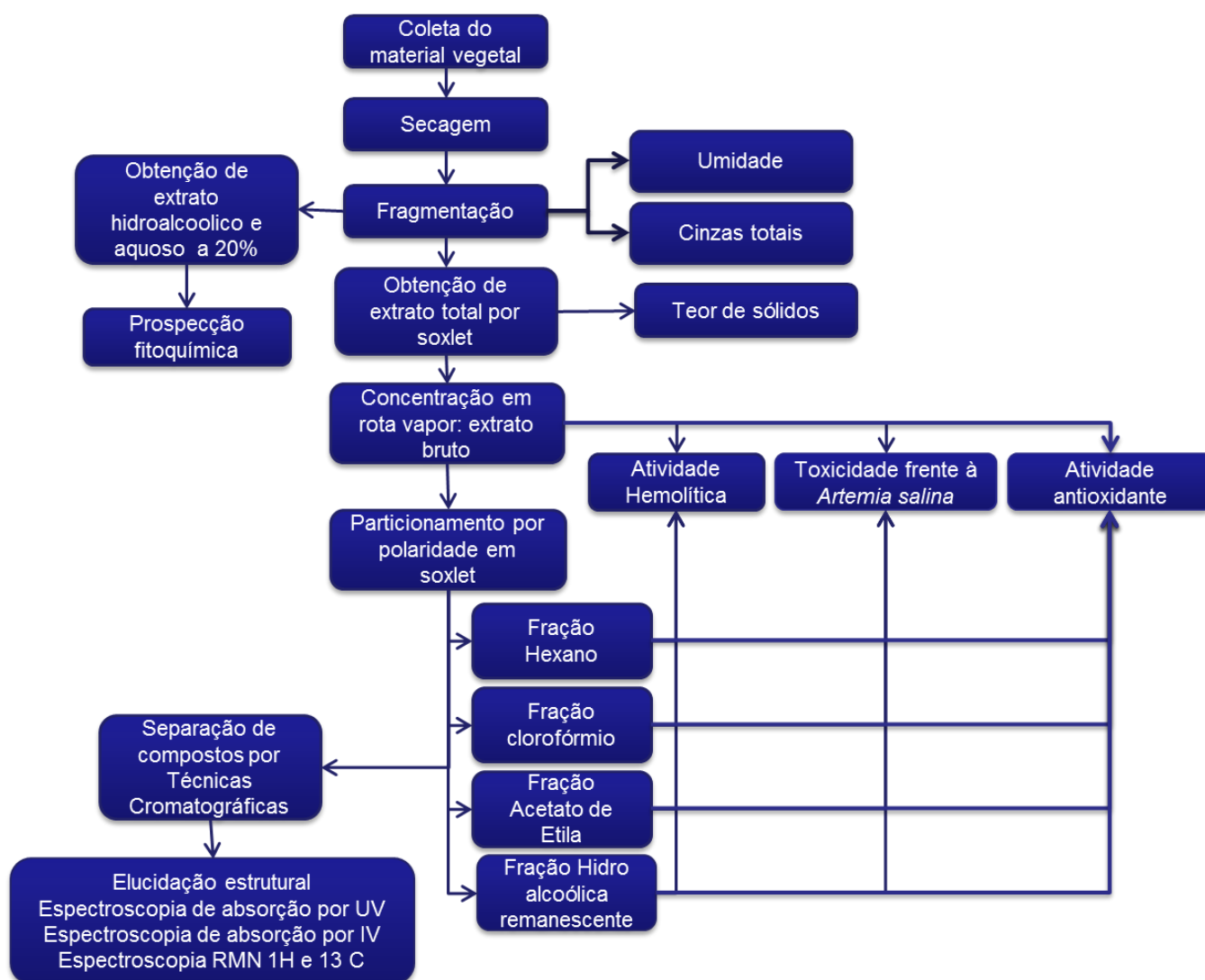


FIGURA 6 - FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA EMPREGADA  
FONTE: A autora (2013)

### 3.1 MATERIAL VEGETAL

#### 3.1.1 Coleta, Identificação e exsicata

Folhas e cascas da planta foram coletadas no mês de abril de 2011, no campus Botânico da Universidade Federal do Paraná, município de Curitiba, estado do Paraná, Brasil.

A determinação botânica foi realizada no herbário do Museu Botânico Municipal da cidade de Curitiba, Estado do Paraná, pelo curador do museu, Osmar dos Santos Ribas. As exsicatas às quais as amostras foram comparadas estão depositadas neste local e registradas sob o número 332898, conforme mostra a figura 7.

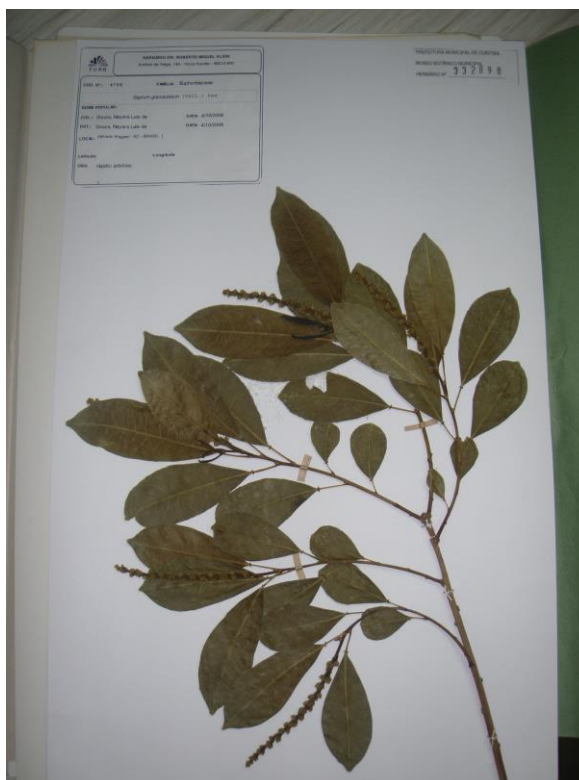


FIGURA 7 - EXSICATA DE *Sapium glandulosum*, ACERVO N<sup>o</sup> 332898  
FONTE: A autora (2013)

A figura 8 destaca as partes aéreas da exsicata da planta depositada no museu botânico, observadas durante a identificação da planta coletada, cujo exemplar coletado pode ser observado na figura 9. Para o desenvolvimento deste projeto foram utilizadas as folhas e a casca de *Sapium glandulosum*. Esta escolha fundamentou-se na intenção da pesquisa em abranger diferentes partes da planta para contribuir com o estudo da espécie.



FIGURA 8- PARTES AÉREAS DE *Sapium glandulosum*  
FONTE: A autora (2013)



FIGURA 9 - PARTES AÉREAS DA PLANTA COLETADA *Sapium glandulosum*  
FONTE: A autora (2013)

## 3.2 ESTUDOS FITOQUÍMICOS

Na investigação fitoquímica, as partes aéreas coletadas foram submetidas à seleção visual, excluindo-se material orgânico estranho e partes não sadias, atacadas por insetos, fungos ou oxidadas. Em seguida, fragmentadas e secas em temperatura ambiente e à sombra. Após a secagem, o material foi armazenado em recipiente apropriado e protegido da luz e umidade.

### 3.2.1 Análises físico-químicas

As análises realizadas para as matérias primas vegetais estão dispostas a seguir.

#### 3.2.1.1 Umidade

A metodologia escolhida para a determinação da umidade está descrita na Farmacopéia Brasileira 5 ed. Cinco gramas da planta pulverizada foram acondicionadas em uma placa de petri previamente dessecada e levadas à estufa a 105 °C por um período de 5 horas, até peso constante. O cálculo utilizado para a determinação do valor da umidade foi:

$$\% = \frac{(\text{peso amostra} + \text{peso placa de petri}) - (\text{peso amostra dessecada} + \text{peso placa de petri})}{\text{peso da amostra}} \times 100$$

#### 3.2.1.2 Cinzas totais

O método utilizado para determinação das cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido está presente na Farmacopéia Brasileira 5 ed. A matéria prima vegetal foi

acondicionada em cadinho previamente dessecado em mufla a 450 °C por 30 minutos. A amostra foi incinerada, aumentando, gradativamente, a temperatura até, no máximo,  $600 \pm 25$  °C, até que todo o carvão tenha sido eliminado. A amostra foi resfriada em um dessecador e pesada. O cálculo da porcentagem de cinzas totais foi calculado em relação à droga seca ao ar.

### 3.2.2 Ensaio sistemático fitoquímico

O ensaio sistemático fitoquímico tem como objetivo a identificação dos principais grupos do metabolismo secundário das espécies vegetais, através da identificação por reações de precipitação ou coloração. Esse ensaio foi realizado segundo MOREIRA (1979). As análises foram realizadas a partir dos extratos hidroalcoólico e aquoso, ambos a 20% p/v, produzidos pelo método de maceração. A partir desses extratos foi determinado o resíduo seco e a presença dos seguintes grupos químicos:

- Extrato hidroalcoólico: glicosídeos flavônicos, alcalóides, esteróides e/ou triterpenos, aminogrupos, glicosídeos cumarínicos e glicosídeos antraquinônicos.
- Extrato aquoso: glicosídeos antociânicos, saponinas, glicosídeos cianogenéticos taninos condensados e hidrolisáveis, aminogrupos e flavonóides.

#### 3.2.2.1 Preparo dos extratos hidroalcoólicos a 20% p/v

O extrato hidroalcoólico foi obtido pelo método de maceração. Cerca de 40 g da matéria prima vegetal seca (casca e folhas) e triturada foram macerados por 200 mL de álcool etílico a 70% v/v em banho maria a 70 °C por uma hora. O macerado

foi filtrado e o volume do extrato completado para 200 mL com álcool etílico, lavando o material com o líquido extrator.

#### 3.2.2.2 Preparo dos extratos aquosos a 20% p/v

O extrato aquoso foi obtido pelo método de maceração. Cerca de 40 g da matéria prima vegetal seca (casca e folhas) e triturada foram macerados por 200 mL de água purificada e em banho maria a 70 °C por uma hora. O macerado foi filtrado e o volume do extrato completado para 200 mL com água purificada, lavando o material com o líquido extrator.

#### 3.2.2.3. Teor de sólido dos extratos a 20% p/v

Uma cápsula de Petri seca, previamente tarada, foi levada à estufa e no interior desta foram adicionados 10 mL dos extratos de folha e casca. Após deixar secar, pesar e procederam-se os cálculos.

Este procedimento foi realizado para os extratos aquoso e hidroalcoólico das folhas e casca da planta.

#### 3.2.2.4 Fracionamento dos extratos hidroalcoólicos

Os extratos hidroalcoólicos foram concentrados no rotavapor até adquirirem um terço do volume inicial. Foi, então, realizado o fracionamento sequencial de cada um dos extratos com hexano, diclorometano, acetato de etila e a fração final é a própria hidroalcoólica. Para isto, o extrato concentrado foi depositado em um funil de separação com 20 mL de hexano. Agitou-se dez vezes. A fração hexano foi separada em um frasco com tampa. Adicionou-se mais 20 mL de hexano para extrair novamente. O procedimento foi repetido com os demais solventes



(diclorometano e acetato de etila, respectivamente). O volume das frações foi completado para 200 mL com os respectivos solventes.

Este processo foi realizado para os extratos das folhas e da casca. As frações foram armazenadas em frascos com tampa e em refrigerador, enquanto não utilizados.

### 3.2.2.5 Pesquisa de alcalóides (MOREIRA, 1979)

As frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica das cascas e das folhas foram levadas à secura 25 mL, em banho maria a 70 °C. O resíduo foi ressuspensionado com 0,5mL de etanol e 10 mL de ácido clorídrico 1%. Cada filtrado foi distribuído em 5 tubos de ensaio contendo 2 mL cada tubo, como pode-se observar no quadro 2. Cada fração foi testada com os quatro reativos para alcaloides abaixo citados.

- Reativo de Mayer: 2 gotas de reagente. Observa-se formação de precipitado branco ou leve turvação branca.
- Reativo de Bertrand: 2 gotas do reagente. Observa-se formação de precipitado branco ou leve turvação branca.
- Reativo de Bouchardat: 2 gotas do reagente. Observa-se formação de precipitado de coloração alaranjado.
- Reativo de Dragendorff: 2 gotas do reagente. Observa-se formação de precipitado de coloração tijolo.

O quinto tubo para cada fração foi utilizado como comparativo (branco), ou seja, continha apenas a amostra.

Em caso de reação positiva, transferiu-se o restante do extrato clorídrico para um funil de separação, alcalinizou-se com hidróxido de amônia até pH 9 ou 10 e extraiu-se com uma solução de clorofórmio e éter (3:1), sendo três extrações de 15 mL. Os extratos de éter clorofórmio foram reunidos e levados à secura em banho maria. Ao resíduo adicionou-se 0,5 mL de etanol e 5 mL de HCL 1%. Aqueceu-se

ligeiramente, após atingir a temperatura ambiente, foi dividido em cinco tubos de ensaio. Os alcaloides foram pesquisados com os reativos gerais para alcaloides.

	<b>Reativos</b>				
	<b>Mayer</b>	<b>Dragendorff</b>	<b>Bouchardt</b>	<b>Bertrand</b>	<b>Branco</b>
<b>Casca</b>	2 mL resíduo hexano	2 mL resíduo hexano	2 mL resíduo hexano	2 mL resíduo hexano	2 mL resíduo hexano
	2 mL resíduo diclorometano	2 mL resíduo diclorometano	2 mL resíduo diclorometano	2 mL resíduo diclorometano	2 mL resíduo diclorometano
	2 mL resíduo acet. de etila	2 mL resíduo acet. de etila	2 mL resíduo acet. de etila	2 mL resíduo acet. de etila	2 mL resíduo acetato de etila
	2 mL resíduo Hidroalcoólico	2 mL resíduo Hidroalcoólico	2 mL resíduo Hidroalcoólico	2 mL resíduo Hidroalcoólico	2 mL resíduo Hidroalcoólico
	2 mL resíduo hexano	2 mL resíduo hexano	2 mL resíduo hexano	2 mL resíduo hexano	2 mL resíduo hexano
<b>Folha</b>	2 mL resíduo diclorometano	2 mL resíduo diclorometano	2 mL resíduo diclorometano	2 mL resíduo diclorometano	2 mL resíduo diclorometano
	2 mL resíduo acet. de etila	2 mL resíduo acet. de etila	2 mL resíduo acet. de etila	2 mL resíduo acet. de etila	2 mL resíduo acet. de etila
	2 mL resíduo Hidroalcoólico	2 mL resíduo Hidroalcoólico	2 mL resíduo Hidroalcoólico	2 mL resíduo Hidroalcoólico	2 mL resíduo Hidroalcoólico
	2 mL resíduo hexano	2 mL resíduo hexano	2 mL resíduo hexano	2 mL resíduo hexano	2 mL resíduo hexano

QUADRO 2 - TUBOS A SEREM PREPARADOS PARA O TESTE DE ALCALÓIDES

### 3.2.2.6 Pesquisa de leucoantocianidinas (MOREIRA, 1979)

Transferiu-se para cada cápsula de porcelana 10 mL das frações hexano, diclorometano, acetato de etila das folhas e cascas e levou-se à secura. Não foi necessário secar a fração hidroalcoólica. Dissolveu-se o resíduo em 5 mL de álcool etílico. Cinco gotas de ácido clorídrico concentrado foram adicionadas às amostras que foram levadas à ebulição.

No caso de reação positiva observa-se efeito batocrômico com o desenvolvimento de coloração vermelha.

### 3.2.2.7 Pesquisa de heterosídeos flavônicos (MOREIRA, 1979)

a. Transferiu-se para cada tubo de ensaio 5 mL das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólico das folhas e casca. Juntou-se 200

mg de limalha de magnésio. Adicionou-se lentamente HCl fumegante (reação em um banho de gelo e dentro da capela). Em caso de flavonas surge uma coloração amarela a vermelha. Em caso de dihidroflavonol a coloração fica entre vermelho e vermelho-sangue. Os derivados antociânicos formam coloração vermelha, tornando-se rosa.

b. Teste do oxálico bórico ou reação de Taubock

Transferiu-se para cada cápsula de porcelana 10 mL das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica das folhas e casca. Levou-se à secura em banho maria e ao resíduo foram adicionadas cinco gotas de acetona e 30mg da mistura de ácido bórico e ácido oxálico (1:1). Agitou-se bem e levou-se à secura. A este resíduo foram adicionados 5 mL de éter etílico. Transferiu-se cada amostra para um tubo de ensaio. Os flavonóis determinam aparecimento de fluorescência amarelo esverdeada sob a luz ultravioleta.

c. Ensaio de Pacheco

Transferiu-se para cada cápsula de porcelana 10 mL das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica das folhas e casca. Levou-se à secura em banho maria. Adicionou-se cristais de acetato de sódio e 0,1 mL de HCl concentrado e aqueceu-se o resíduo em um fogareiro. Os dihidroflavonóis formam uma coloração roxa característica.

d. Ensaio com Zn em HCl

Transferiu-se para cada cápsula de porcelana 10 mL das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica das folhas e casca. Levou-se à secura em Banho Maria. Dissolveu-se o resíduo com 10 mL de etanol. Não houve necessidade de levar à secura a fração hidroalcoólica.

Transferiu-se 5 mL de cada fração para um tubo de ensaio. Adicionou-se à cada tubo uma pastilha de zinco. Adicionar HCl fumegante (reação em um banho de gelo e dentro da capela). Os dihidroflavonóis apresentam coloração roxa viloleta.

### 3.2.2.8 Pesquisa de cumarinas (MOREIRA, 1979)

Transferiu-se para cada cápsula de porcelana 30 mL das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e concentrar até 5 mL. Acidificou-se 15 mL da fração hidroalcoólica com ácido clorídrico concentrado até pH 1,0 e concentrou-se até 5mL. Após esfriar e transferir cada fração para funil de separação de 250 mL, extraiu-se duas vezes com 10 mL de éter etílico. Caso a separação não tenha ocorrido, foi adicionada no funil de separação, 10 mL de água deionizada. Reduziu-se o extrato orgânico para 5 mL em Banho Maria. Transferiu-se 3 mL de cada fração para tubos de ensaio. Adicionou-se 2 mL de NaOH N e os tubos de ensaio foram levados a uma câmara de luz ultravioleta em 366 nm. As amostras foram deixadas em exposição à luz por 15 minutos.

No caso de reação positiva observa-se o aparecimento de coloração fluorescente azul ou verde amarelada sob a luz ultravioleta.

Depositou-se os 2 mL restantes de cada fração em um papel filtro com três pontos previamente marcados com grafite, de modo a obter três manchas de aproximadamente 1 cm para cada fração. Tratou-se as manchas 1 e 2 com uma gota de solução de NaOH N. A mancha 1 foi coberta com uma moeda ou com um pedaço de papel alumínio. O papel filtro ficou à exposição da luz ultravioleta por 15 minutos. Em caso de reação positiva para cumarinas observa-se o aparecimento de coloração azul ou verde fluorescente na mancha 2.

### 3.2.2.9 Pesquisa de substâncias iridoidais (MOREIRA, 1979)

a. Transferiu-se para cada tubo de ensaio 2 mL das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica e adicionou-se pequena quantidade de cristais de floroglucinol e 1 mL de HCl R.

O aparecimento de coloração verde escura indica a presença de substâncias iridoidais.

b. Transferiu-se para cada tubo de ensaio 2 mL das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica e adicionou-se duas gotas de ácido sulfúrico R.

O aparecimento de coloração rosa violáceo indica a presença de substâncias iridoidais.

c. Transferiu-se para cada tubo de ensaio 2 mL das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica e adicionou-se cristais de vanilina e duas gotas de ácido sulfúrico R.

O aparecimento de coloração rosa cereja indica a presença de substâncias iridoidais.

#### 3.2.2.10 Pesquisa de antraquinonas (MOREIRA, 1979)

Levou-se à fervura 30 mL das frações hexano casca, acetato de etila das folhas e da casca por 30 minutos sob refluxo adicionando 5 mL de ácido sulfúrico 10%. A filtração foi realizada ainda à quente por papel filtro. Ao filtrado foram adicionados 30 mL de água destilada e transferido para um funil de separação. A fração orgânica foi separada e concentrada até aproximadamente 5 mL. Os concentrados foram transferidos para tubos de ensaio e a cada tubo foi adicionado 5 mL de hidróxido de amônia e agitar lentamente. O aparecimento de coloração rósea ou avermelhada indica a presença de hidroxiantraquinonas e naftoquinonas.

#### 3.2.2.11 Pesquisa de esteróis e triterpenos (MOREIRA, 1979)

a. Foram adicionados 30 mL das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica em cápsulas de porcelana e evaporados até secar em banho-maria. Com o auxílio de um bastão de vidro, dissolveu-se o extrato seco em 5 mL de clorofórmio. Pipetou-se 1 mL de cada amostra para tubos de ensaio e o volume foi completado para 2 mL com clorofórmio. Efetuou-se a reação de Liberman

Bouchard, em uma capela, adicionando 1 mL de anidrido acético e 2 mL de ácido sulfúrico P.A. lentamente. A formação de coloração rósea escura ou azul indica a presença da função carbonila na posição 3 e duplo enlace em 5 , 6, enquanto que a coloração verde indica função hidroxila na posição 3 e duplo enlace em 5 ,6. Se houver aparecimento de coloração amarela há indicativo de metila em C<sub>14</sub>.

b. Reação de Keller Kelliani

Separou-se quatro tubos aos quais foram transferidos 2 mL das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica das cascas e folhas e levados à secura. Dissolveu-se o resíduo com 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução aquosa de cloreto férrico a 1%. A mistura foi transferida cautelosamente para um tubo de ensaio que continha 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. O desenvolvimento de coloração azul ou verde na zona de contato dos dois líquidos e a coloração verde na fase acética indica reação para desoxiaçúcares. Coloração azul indica esteroides e verde indica triterpenos.

3.2.2.12 Pesquisa de heterosídeos antociânicos (MOREIRA, 1979)

Foi utilizado extrato aquoso das folhas e das cascas. Três porções de 5 mL de cada extrato foram separadas em tubos de ensaio médio e conduzidas até a capela. Procedeu-se a análise depositando no tubo nº 01, 1 mL de ácido clorídrico concentrado e no tubo nº 02, 1 mL de hidróxido de amônio concentrado, o tubo 03 foi usado como branco para comparação de mudança de cor. A coloração em meio ácido apresenta tons avermelhados e em meio básico apresenta tons azulados, mas a mudança de coloração em relação ao extrato padrão, já indica reação positiva.

3.2.2.13 Pesquisa de heterosídeos saponínicos (MOREIRA, 1979)

Os tubos utilizados na reação anterior foram agitados energicamente por cinco minutos e medir o anel de espuma formado. Os tubos ficaram em repouso por

30 minutos e repetiu-se a medida do anel de espuma. Espuma de altura maior que 1 cm e persistente após o repouso é indicativo da presença de heterosídeos saponínicos.

#### 3.2.2.14 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos (MOREIRA, 1979)

Transferiu-se para cada tubo de ensaio 5 mL dos extratos aquosos das cascas e folhas, de modo a não umedecer as paredes do tubo. Adicionou-se 1 mL da solução aquosa de ácido sulfúrico N. Suspendeu-se uma tira de papel picro-sódico com auxílio de uma rolha de cortiça, de maneira que o papel não toque o extrato. O tubo de ensaio foi levado para o banho maria a 60 °C por 30 minutos.

O aparecimento de coloração avermelhada no papel picro sódico indica a presença de heterosídeos cianogenéticos.

#### 3.2.2.15 Pesquisa de taninos (MOREIRA, 1979)

##### a. Cloreto férrico

Adicionou-se a 5 mL de extrato aquoso, 5 gotas de cloreto férrico 1%. O desenvolvimento de coloração azul é indicativo da presença de taninos. A coloração verde é indicativa de flavonóides e marrom de polifenóis.

##### b. Reação com formol clorídrico (ensaio de Staniasny)

Transferiu-se para cada balão de fundo chato ou redondo 30 mL dos extratos das folhas e cascas. Adicionou-se a cada balão 6 mL de formaldeído 40% e 4 mL de ácido clorídrico 37%. O balão foi acoplado a um condensador de bolas e levado a refluxo durante uma hora. Após esfriar e filtrar, o filtrado foi reservado para a pesquisa de taninos hidrolisáveis. Lavou-se o resíduo no papel filtro com uma solução de álcool 50% e gotejou-se sobre o resíduo gotas de hidróxido de potássio a 5%. O desenvolvimento de coloração verde é indicativo da presença de taninos condensados.

Ao filtrado foi adicionado excesso de acetato de sódio, sem agitar, e gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1%. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis.

#### 3.2.2.16 Pesquisa de aminogrupos (MOREIRA, 1979)

Foram concentrados 10 mL do extrato aquoso das cascas e folhas a uma temperatura de 60 °C. Em um pedaço de papel de filtro, com o auxílio de um bastão de vidro foram formadas duas manchas. O papel de filtro contendo as manchas foi levado à capela e o reativo de Ninhidrina foi adicionado somente sobre uma mancha, deixando a outra mancha como comparativo para referência. O papel de filtro foi levado à estufa à temperatura de 100 °C durante 15 minutos. A coloração azul violácea indica reação positiva.

#### 3.2.2.17 Pesquisa de ácidos fixos (MOREIRA, 1979)

Transferiu-se 20 mL de extrato aquoso das folhas e cascas para cada balão de fundo chato ou redondo juntamente com 2 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 1N. O conteúdo foi levado ao refluxo por 30 minutos, resfriado e acidificado com ácido sulfúrico 1N. Foi realizada extração por 3 vezes com 10 mL de éter etílico. Os extratos etéreos foram reunidos, tratados com carvão ativo, filtrados e levados à secura, em banho maria a 50 °C. Aqueceu-se o resíduo durante 10 minutos a 100 °C e após, adicionou-se 5 mL de solução de hidróxido de amônio 1N, filtrou-se novamente e transferiu-se para um papel de filtro 3 gotas de modo a obter manchas de 1 cm de diâmetro. Ao segundo ponto adicionou-se uma gota do reativo de Nessler. Em uma terceira mancha foi colocado apenas o reativo de Nessler. Levou-se papel de filtro à estufa à temperatura de 100 °C durante 15 minutos. A coloração do ponto dois, quando diferente dos pontos 1 e 3 indica reação positiva. O desenvolvimento de coloração indica a presença de ácidos fixos.



### 3.2.2.18 Pesquisa de ácidos voláteis (MOREIRA, 1979)

Transferiu-se para um tubo de ensaio 5 mL do extrato aquoso e 1 mL de ácido sulfúrico de modo a não umedecer as paredes do tubo. Suspendeu-se uma tira de papel indicador de pH com auxílio de uma rolha de cortiça, de modo que o papel não tocasse o extrato. Levou-se o tubo de ensaio para um banho maria a 60 °C, por 30 minutos. A coloração avermelhada indicou a presença de ácidos voláteis.

### 3.2.2.19 Pesquisa de gomas e mucilagens (MOREIRA, 1979)

Utilizou-se o extrato aquoso. Transferiu-se uma parte do filtrado para um tubo de ensaio. Depositou-se de 3 a 4 gotas da solução de acetato de chumbo dentro do tubo. Após alguns minutos para a formação de turvação ou goma indica reação positiva.

## 3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

### 3.3.1 Extração por Soxhlet

As amostras de planta seca das respectivas partes (folha e casca), estabilizada e moída foram pesadas e extraídas em aparelho de Soxhlet modificado segundo (CARVALHO, 2001).

Um aparelho de Soxhlet (figura 10) é conectado a um condensador de bolas e a um balão de fundo chato com capacidade de 3 L contendo pérolas de vidro. A este sistema é adicionado álcool etílico 77 % até aproximadamente 1,5 L. Todo o sistema é levado ao aquecimento em manta aquecedora e deixado em refluxo por doze horas, de modo que o extrato alcoólico seja obtido por extração em meio solvatado (CARVALHO, 2001).



FIGURA 10 - APARELHO DE SOXHLET  
FONTE: A autora (2013)

Para a utilização deste equipamento, foi introduzido cerca de 500 g do material vegetal seco (folhas ou cascas) no suporte de vidro do aparelho (este deve conter uma placa porosa e uma camada de algodão para conter o material vegetal). Sobre este sistema foram adicionados cerca de 1,5 L de álcool 77 % para extração. Com o sistema sob aquecimento, o líquido extrato presente no balão é evaporado e posteriormente condensado no condensador de bolas. Deste modo, o líquido extrator percorre novamente o material vegetal, permitindo desta forma a extração do mesmo.

No momento em que o menisco do extrato no canal lateral do Soxhlet atinge o ponto de refluxo, o extrato era descarregado no balão por sifonamento e o processo repetido inúmeras vezes até se completarem 12 horas. Este procedimento previne a degradação térmica de substâncias no balão, uma vez que a quantidade de líquido extrator é constante no sistema, além de ser capaz de solvatar os compostos presentes.

O processo foi repetido o número de vezes necessárias para extrair toda a quantidade de folhas ou cascas. O extrato obtido foi denominado extrato bruto. A partir deste extrato foi realizada a obtenção das frações por partição líquido-líquido, com solventes de diferentes polaridades.

### 3.3.2 Análises físico-químicas

#### 3.3.2.1 Determinação do teor de sólidos

A análise do teor de sólidos foi realizada segundo a Farmacopeia brasileira V (2010). Pipetar volumetricamente 10 mL do extrato bruto e transferir para uma placa de petri previamente dessecada. A placa é adicionada à estufa a 105 °C até peso constante. A diferença entre o peso da placa com o resíduo do extrato e a placa vazia fornece o teor de sólidos em 10 mL do extrato.

### 3.4 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES

As frações das espécies vegetais foram obtidas pelo método de partição líquido-líquido.

As frações foram obtidas utilizando solventes de diferentes polaridades na seguinte ordem: n-hexano, clorofórmio e acetato de etila. A fração restante foi denominada fração hidroalcoólica remanescente. Todos os solventes utilizados foram de padrão analítico (PA).

#### 3.4.1 Sistema de partição líquido - líquido

Para a partição líquido-líquido foi utilizado o aparelho soxhlet modificado conectado ao condensador de bolas e a um balão de fundo chato com pérolas de vidro. Todo o sistema foi levado ao aquecimento em manta aquecedora e deixado em refluxo por cerca de 6 horas.

### 3.4.2 Determinação do teor de sólidos

A análise do teor de sólidos foi realizada segundo a Farmacopeia brasileira V. Pipetar volumetricamente 10 mL de cada fração e transferir para uma placa de petri previamente dessecada. A placa é adicionada à estufa a 105 °C até peso constante. A diferença entre o peso da placa com o resíduo do extrato e a placa vazia fornece o teor de sólidos em 10 mL do extrato.

## 3.5 PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS

A purificação das frações foi realizada através da cromatografia em coluna. As frações clorofórmica e acetato de etila das folhas foram solubilizadas em metanol e incorporadas à aproximadamente 18g de sílica-gel para a formação das pastilhas de sílica. Cada uma das duas pastilhas foi submetida à cromatografia em coluna, onde ocorreu a eluição (figura 11) da amostra através do sistema de passagem de solventes com gradientes de polaridades crescentes. Os solventes utilizados foram hexano, acetato de etila e metanol. O gradiente de polaridade da fase móvel teve início com uma mistura de hexano: acetato de etila (70:30), aumentando a proporção de acetato de etila em 5% a cada 50 mL até chegar a 100% de acetato de etila. Em seguida, foi adicionado metanol à fase móvel, aumentando em 5% a cada 50 mL, até chegar à proporção final de acetato de etila:metanol (40:60). Cada frasco foi recolhido com aproximadamente 15 mL, totalizando 60 frascos para cada fração (clorofórmio folha e acetato de etila folha), como mostra a figura 12.

O controle de eluição foi realizado com lâmpada de luz UV a 360 nm. As frações recolhidas foram observadas por cromatografia em camada delgada, utilizando-se cromatoplasmas de Sílica-gel 60 F254 Merck® e visualizadas com lâmpada UV nos comprimentos de onda de 360 nm e foram reunidas de acordo com as características em comum.

Foram isolados cinco compostos: FOCAM1, FOCAM2, FOCAM3, FOCAM4 e FOCAM5.



FIGURA 11 - COLUNA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO  
FONTE: A Autora (2013)



FIGURA 12 - FRASCOS OBTIDOS APÓS A REALIZAÇÃO DE CROMATOGRAFIA EM COLUNA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA  
FONTE: A Autora (2013)

### 3.6 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

As substâncias isoladas foram submetidas às análises espectrométricas para elucidação de sua estrutura. As análises que foram realizadas foram: espectroscopia de absorção no ultravioleta, em infravermelho e espectroscopia de ressonância nuclear magnética de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , incluindo os experimentos bidimensionais HMBC e HSQC. Bruker® modelo DPX 200 MHz, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  a 200,12 e 50,56 MHz, respectivamente, todas em DMSO deuterado. Os experimentos bidimensionais foram realizados em um equipamento Bruker® de 400MHz.

### 3.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 3.7.1 Formação do complexo fosfomolibdênico

É um ensaio capaz de avaliar a capacidade antioxidante de componentes hidrofílicos e lipofílicos. Trata-se de um teste simples e econômico que avalia a capacidade antioxidante total da amostra e a metodologia utilizada foi segundo PRIETO, PINEDA e AGUILAR (1999).

O reativo foi preparado através da adição de uma solução com fosfato de sódio 0,1 M (28 mL), molibdato de amônio 0,03 M (12 mL) e ácido sulfúrico 3 M (20 mL), completando com água para 100 mL. Esse reativo deve ser preparado no momento do uso. Soluções padrões de vitamina C e rutina, bem como as amostras a serem testadas, devem estar na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  em metanol (BIANCO, 2003).

Em um tubo de ensaio, foi retirada uma alíquota de 0,3 mL da amostra, e adicionado 3 mL de reativo. O mesmo foi feito para os padrões e para um branco, o qual deve estar constituído de 0,3 mL de metanol e 3 mL de reativo. A reação aconteceu a 95 °C, em banho maria, por 90 minutos. A análise foi realizada em triplicata, com os tubos hermeticamente fechados. Após os tubos atingirem a

temperatura ambiente procedeu-se à leitura das absorvâncias (Abs) em 695 nm. Os resultados foram expressos em atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C e rutina, conforme as equações a seguir.

$$\text{AAR\% EM RELAÇÃO À VITAMINA C} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (vitamina C)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$$

$$\text{AAR\% EM RELAÇÃO À RUTINA} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (rutina)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$$

### 3.7.2 Teste com espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O teste foi realizado segundo Moraes e colaboradores (2006) com modificações. Foram adicionados 0,1 mL dos extratos e frações secas a 1000, 500 e 100 ppm em metanol foram adicionados a 0,4 mL de H<sub>2</sub>O, 0,5 mL de gema de ovo a 10% (p/v) em água, 50 µl de ABAP 0,07M (cloreto de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano), 1,5 mL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1,5 mL de uma solução de SDS 1,1% (dodecil sulfato de sódio) e TBA 0,8% (ácido tiobarbitúrico). Sendo então levado a banho-maria a 95 °C por 1 hora. Após resfriamento da solução foi adicionado 5,0 mL de 1-butanol, e centrifugado a 3000 rpm por 10 min., e em seguida foi realizada a leitura do sobrenadante a 532nm. Como branco foi utilizado o 1-butanol. Como controle negativo foi utilizada a mesma solução, sendo nesta a amostra substituída por 0,1 mL de metanol. O teste foi realizado em 5 experimentos independentes. As espécies reativas do ácido tiobarbitúrico foram calculadas através da equação (MORAIS, CATUNDA-JUNIOR, SILVA, MARTINS-NETO, RONDINA CARDOSO, 2006):

$$IA\% = \left(1 - \frac{Abs_A}{Abs_{CN}}\right) \times 100$$

	100ppm	500ppm	1000ppm	Cont. neg.
Sol amos.	0,005mL	0,025mL	0,05mL	---
Metanol	0,045mL	0,025mL	----	0,05mL

QUADRO 3 - EXTRATOS E FRAÇÕES SECAS (3MG/ML)

### 3.7.3 Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é um radical livre e estável com o qual os compostos vegetais que apresentam potencial atividade antioxidante interagem, permutando os elétrons ou átomos de hidrogênio para o radical livre reduzindo-o. É um método fácil, rápido e muito utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de amostras vegetais.

O potencial de redução do radical DPPH das amostras (frações e substância M5) foi analisado espectrofotometricamente segundo Mensor e colaboradores.(2001). Foram preparadas cinco soluções metanólicas das frações nas concentrações de 2,0 a 12,5 µg/mL, das quais 2,5 mL foram adicionados a 1 mL de uma solução metanólica de DPPH na concentração de 0,03 mmol/mL. Para as frações hexano foram utilizadas cinco soluções com concentrações entre 100 e 300 µg/mL. Para cada amostra foi preparado um branco com 2,5 mL da solução e 1 mL de metanol para cada concentração. Paralelamente foi feito um controle com 2,5 mL de metanol e 1 mL de DPPH. Após trinta minutos de reação foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 518 nm, correspondente a absorção máxima do radical em estudo. Como padrões foram utilizados rutina nas concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL e vitamina C nas concentrações de 1,6, 3,2, 4,8, 6,4 e 8,0 µg/mL. A habilidade dos extratos em reduzir o radical foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ de inibição do DPPH} = 100 - \{(A \text{ amostra} - A \text{ branco}) \times 100 / A \text{ controle}\}$$



### 3.8 ANÁLISE DA ATIVIDADE SOBRE *Artemia salina*

A mensuração da toxicidade pode ser útil em investigações biológicas, especialmente ecológicas, para avaliar, por exemplo, a toxicidade de possíveis fontes de poluição, verificar o potencial e possível perigo de novos pesticidas, determinar as defesas anti-herbívoros em folhas, ou ainda para fazer um *screening* de extratos de plantas de possível potencial medicinal (RICE, MANESS, 2004).

Este método foi inicialmente proposto para esta finalidade por MEYER e colaboradores, em 1982.

O método determina os valores de  $CL_{50}$  em  $\mu\text{g/mL}$  de substâncias ativas e extratos em meio salino.

#### 3.8.1 Preparo da solução salina

Para obtenção das larvas de *Artemia salina* é necessário incubar os cistos deste microcústeo em água salgada. Portanto, foi preparada água do mar artificial pela adição de 14,31 g de sal marinho adquirido no comércio em 400 mL de água purificada.

O pH foi ajustado para 9,0 com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para evitar o risco de morte das larvas por diminuição do pH durante a incubação. Segundo LEWAN e colaboradores. (1992), um pH superior a 6,0 é essencial para o desenvolvimento de *Artemia salina*, e um pH superior a 10,5 deve ser evitado.

#### 3.8.2 Eclosão dos cistos

A eclosão dos cistos de *Artemia salina* (200 mg /400 mL) foi estimulada através da sua incubação em água salgada por 48 horas, sob aeração contínua e expostos à luz diurna. A temperatura foi controlada entre 27 e 30 °C e o pH entre 8-

9. Na primeira hora do processo havia iluminação (20 W) sobre o recipiente (MEYER *ET AL.*, 1982).

### 3.8.3 Preparo das amostras

O estudo foi realizado para o extrato bruto e suas frações. Foi preparada uma solução de concentração de 10 mg/mL para cada amostra analisada (solução 1). A partir desta solução, foi preparada a solução 2 pela diluição de 1 mL da solução 1 em 9 mL de solvente (a ser determinado de acordo com a solubilidade de cada amostra). Em três tubos de ensaio foram transferidas as seguintes tomadas de amostras: para o tubo 1 foram adicionados 250 µl da solução 1, para o tubo 2 foram adicionados 25 µl da solução 1 e para o tubo 3 apenas 25 µl da solução 2. Realizou-se esse procedimento em triplicata.

O controle negativo desta metodologia foi preparado pela adição de 250 µl do solvente em um tubo de ensaio. E para o controle positivo foi utilizado uma solução de sulfato de quinidina, nas três concentrações.

Todos os tubos foram levados para estufa por 24 horas para evaporação completa do solvente.

### 3.8.4 Avaliação da toxicidade

Após a eclosão dos cistos, foram transferidas 30 náuplios de *Artemia salina* para cada tubo de ensaio contendo as frações e para os tubos controles. O volume de todos os tubos foi ajustado com água do mar artificial para 2,5 mL.

Após 24 horas foi realizada a contagem dos náuplios mortos e vivos com auxílio de lupa e iluminação incandescente.

Os dados foram submetidos a análise pelo método estatístico Probitos (FINNEY, 1947) e determinados os valores de  $LC_{50}$  e 95% de intervalos de confiança. As frações foram consideradas ativas quando  $LC_{50}$  foi menor que 1000 ppm (MEYER *ET AL.*, 1982).

### 3.9 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Esta análise avalia a capacidade da substância estudada de realizar o rompimento das hemácias liberando hemoglobina no plasma. Foram testados os extratos e frações de *Sapium glandulosum*.

#### 3.9.1 Atividade hemolítica por difusão em Agar (FLACH, KARNOPP, CORÇÃO, 2005)

Em papel Whatman nº 1, foi aplicado de 10 µL a 20 µL da amostra a ser testada na concentração de 1000 µg/mL.

O controle positivo foi feito de uma solução de saponina ou solução 2% p/v de Triton que foi aplicada sobre o papel whatman 1000 µg/mL.

O controle negativo foi realizado com uma Solução salina 0,9%, que foi aplicada sobre o papel Whatman nº 1.

Além destes controles foi também feito o controle do solvente (metanol) empregado que foi aplicado sobre papel Whatman nº 1.

Após este procedimento os papeis Whatman nº 1 acrescidos das amostras, foram levados à secar, em estufa a 50 °C, e aplicados sobre placa de Ágar sangue. A incubação foi de 24 horas em estufa a 35 °C e após este processo o halo formado no Ágar sangue foi medido e comparado aos controles.

#### 3.9.2 Atividade hemolítica em sangue de carneiro (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5 ed., 2010)

Para o preparo da solução foi transferido 1 mL de sangue de carneiro (Marca Newprov) para o balão volumétrico de 50 mL e completado o volume com tampão fosfato pH 7,4. (Suspensão diluída 2%).

A solução somente pode ser usada enquanto o líquido sobrenadante permanecer límpido e incolor e deve ser mantida fria.

### 3.9.2.1 Teste preliminar

Para a realização do teste principal foi necessário preparar a diluição em série do extrato vegetal com a solução tampão fosfato e suspensão de sangue a 2%. Foram usados quatro tubos de ensaio, partindo do extrato de *Sapium glandulosum* na concentração de 1 mg/mL, conforme o quadro abaixo:

	1º tubo	2º tubo	3º tubo	4º tubo
Extrato vegetal (mL)	0,10	0,20	0,50	1,00
Tampão fosfato pH 7,4 (mL)	0,90	0,80	0,50	-
Suspensão de sangue (2%) (mL)	1,00	1,00	1,00	1,00

QUADRO 4 - SOLUÇÕES PARA TESTE PRELIMINAR.

Após o preparo da solução os tubos foram agitados cuidadosamente evitando a formação de espuma. Após trinta minutos os tubos foram agitados novamente e deixados em repouso por 150 minutos. Passado este tempo, os tubos foram centrifugados por cinco minutos, a 3000 rpm. Após este processo os tubos de ensaio foram avaliados para hemólise total, ou seja, onde ocorreu solução límpida, vermelha e sem depósito de eritrócitos. Quando há a hemólise os tubos de ensaio adotam-se os procedimentos descritos no quadro abaixo:

OCORRÊNCIA DE HEMÓLISE	Procedimentos
Apenas no 4º tubo de ensaio	Foi usado extrato original para teste principal
Nos tubos de ensaio 3 e 4	Foi diluído duas vezes o extrato vegetal com tampão fosfato
Nos tubos de ensaio 2, 3 e 4	Preparou-se solução diluída 5 vezes

QUADRO 5 - PROCEDIMENTO PARA OCORRÊNCIA DE HEMÓLISE

Após estes procedimentos se em 6 horas todos os tubos de ensaio apresentaram solução límpida e vermelha é necessário preparar uma solução diluída dez vezes soro fisiológico e fazer o teste preliminar, como descrito acima.

### 3.9.2.2 Teste principal

Partindo da análise do teste preliminar, se positivo, foi preparada a diluição em série em 13 tubos de ensaio com tampão fosfato pH 7,4 e suspensão de sangue à 2%, conforme o quadro 6.

Após o processo descrito no quadro acima, os resultados foram observados por 24 horas e a partir deste foi calculada a quantidade do material vegetal em gramas, ou proporção em g/mL que produz hemólise total (b).

Tubos	1º tubo	2º tubo	3º tubo	4º tubo	5º tubo	6º tubo	7º tubo	8º tubo	9º tubo	10º tubo	11º tubo	12º tubo	13º tubo
Extrato ou diluição (mL)	0,40	0,45	0,50	0,55	0,60	0,65	0,70	0,75	0,80	0,85	0,90	0,95	1,00
Tampão fosfato	0,60	0,55	0,50	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	-
Suspensão de sangue 2%	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

QUADRO 6 - SOLUÇÕES PARA TESTE PRINCIPAL

Para saponinas:

A referência para controle positivo do teste é a saponina. Para a realização do teste foi necessário pesar exatamente 10 mg de Saponina R para o balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com tampão fosfato pH 7,4. Foi utilizada solução salina recém-preparada.

Foi preparada uma série de diluições de saponina como descrito anteriormente para o extrato vegetal. A quantidade de saponinas (g) que produz hemólise total (a) foi calculada. Fórmula para calcular a atividade hemolítica do controle positivo.

$$1000 \times a/b$$

1000 = atividade hemolítica da saponina em relação ao sangue de carneiro

a= quantidade em gramas de saponina

b= quantidade em gramas de material vegetal

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios de atividade antioxidante foram analisados estatisticamente através da avaliação da variância pelo teste ANOVA seguida da análise de diferença pelo teste de Tukey (utilizando o programa Statística 5.1).

Os dados de avaliação de toxicidade frente aos náuplios de *Artemia salina* foram submetidos à análise pelo método estatístico Probitos (FINNEY, 1947) e determinados os valores de  $LC_{50}$  e 95% de intervalos de confiança.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 QUANTIDADE DE MATERIAL COLETADO

Foram coletados 1,6 kg de casca de *Sapium glandulosum*, enquanto que de folhas, coletou-se 1,2 kg.

### 4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA PLANTA

#### 4.2.1 Umidade

Na tabela abaixo se encontram os valores de umidade obtidos para casca e folha de *Sapium glandulosum*.

TABELA 1 - UMIDADE (%) DA FOLHA

	Placa	Amostra	Placa + amostra	Após estufa	Amostra sem umidade	Umidade (%)	Média Umidade (%)
<b>Folha</b>	-	-	-	-	-	-	12,4514
<b>Folha</b>	24,3672	1,0022	25,3694	25,2547	0,1147	11,4448	
<b>Folha</b>	21,5336	1,0009	22,5345	22,3998	0,1347	13,4579	
<b>Casca</b>	22,7526	1,0042	23,7568	23,5961	0,1607	16,0028	13,3680
<b>Casca</b>	22,3275	1,0006	23,3281	23,1984	0,1297	12,9622	
<b>Casca</b>	22,1515	1,0010	23,1525	23,0410	0,1115	11,1389	

FONTE: A autora (2013)

As folhas de *Sapium glandulosum* apresentaram uma umidade de 12,45%, enquanto que a casca da planta teve 13% umidade segundo o ensaio realizado.

Este teste de umidade é importante para os dados de caracterização da planta. Os dados obtidos da pesquisa são utilizados em controle de qualidade físico-químico de fitoterápicos.

#### 4.2.2 Cinzas totais

Na tabela abaixo se encontram os valores de cinzas totais obtidos para casca e folha de *Sapium glandulosum*.

TABELA 2 - CINZAS TOTAIS (%) DO MATERIAL COLETADO

	Placa	Amostra	Placa + amostra	placa + Cinzas	Peso Cinzas	Cinzas (%)	Média Cinzas (%)
<b>Folha</b>	23,6597	0,9991	24,6588	23,7563	0,9025	9,6687	7,4626
<b>Folha</b>	24,3672	1,0022	25,3694	24,4402	0,9292	7,2840	
<b>Folha</b>	21,5336	1,0009	22,5345	21,5880	0,9465	5,4351	
<b>Casca</b>	-	-	-	-	-	-	5,0958
<b>Casca</b>	22,3275	1,0006	23,3281	22,3702	0,9579	4,2674	
<b>Casca</b>	22,1515	1,0010	23,1525	22,2108	0,9417	5,9241	

FONTE: A autora (2013)

As folhas de *Sapium glandulosum* apresentaram 7,46% de cinzas, enquanto que a casca da planta teve 5,1% de cinzas segundo o ensaio realizado.

Igualmente ao teste de umidade, o experimento de cinzas totais é utilizado para o controle físico-químico de plantas utilizadas na fabricação de medicamentos fitoterápicos.

O valor encontrado é relativamente alto em comparação com o valor geralmente encontrado na literatura. Uma vez que este teste quantifica a porcentagem de minerais intrínsecos e extrínsecos, pode-se sugerir a presença de, por exemplo, cristais de oxalato de cálcio na planta. Porém, para que isto possa ser afirmado, faz-se necessária a realização de, por exemplo, testes de morfoanatomia das folhas e caule.

#### 4.3 ENSAIO SISTEMÁTICO FITOQUÍMICO

Os ensaios com as frações dos extratos hidroalcoólicos foram realizados, e os resultados obtidos encontram-se dispostos no quadro 7:



ENSAIO	CASCA				FOLHAS			
	Hexano	Diclorom	Acetato de Etila	Hidroalc	Hexano	Diclorom	Acetato de Etila	Hidroalc
<b>ALCALÓIDES</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
1. Mayer	-	-	-	-	-	-	-	-
2. Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-
3. Bouchardat	-	-	-	-	-	-	-	-
4. Bertrand	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>LEUCOANTO CIANIDINAS</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>HETEROSÍDEOS FLAVÔNICOS</b>	-	Marrom arroxeado	Lilás	-	-	-	Verm.	Laranja
<b>OXÁLICO BÓRICO</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>ENSAIO DE PACHECO</b>	-	-	-	-	-	-	Roxo	-
<b>ENSAIO COM Zn EM HCL</b>	-	-	Rosa claro a roxo	-	-	-	-	-
<b>CUMARINAS</b>	+	-	-	+	-	-	-	-
<b>IRIDÓIDES</b>	-	-	-	-	+	+	-	-
Floroglucinol	-	-	-	-	+	-	-	-
Ácido Sulfúrico	-	-	-	-	+	-	-	-
Ácido sulfúrico e vanilina	+	-	-	-	+	-	-	-
<b>HETEROSÍDEO ANTRAQUINÔNICO</b>	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>ESTERÓIDES/ TRITERPENOS</b>	Verm. escuro	Verm.	Amarelo	Amarelo	Verm.	Verm.	Amar.	Amar.
Keller Kelliani	Verm.	-	-	-	Verde	Verde	Verde	-

QUADRO 7 - RESULTADOS DA MARCHA FITOQUÍMICA COM AS FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO  
FONTE: A autora (2013)

O teste de heterosídeos flavônicos foi positivo para as frações diclorometano e acetato de etila do caule, além das frações acetato de etila e hidroalcoólica das folhas. A fração diclorometano da casca assumiu uma coloração marrom arroxeada, indicando a provável presença de derivados antociânicos, bem como a fração acetato de etila também da casca, que se tornou lilás. O teste com as folhas para a fração acetato de etila teve como resultado uma coloração vermelha intensa, indicativa da presença de flavonóis e diidroflavonóis. A fração hidroalcoólica do extrato das folhas apresentou coloração alaranjada, compatível com a presença de flavonas.

O ensaio de Pacheco apresentou reação positiva para a fração acetato de etila do extrato das folhas, indicando a presença de diidroflavononóis.

O experimento com Zn em HCl foi positivo apenas para a fração acetato de etila das folhas, indicativo da presença de dihidroflavononóis nesta fração.

O teste para cumarinas indicou a possível presença destas nas frações hexano e hidroalcoólica do extrato da casca.

O teste para substâncias iridoidais foi positivo para a fração hexano do extrato das folhas. O teste de florogucinol indicou também a presença de iridóides na fração diclorometano, também das folhas. É importante ressaltar que a coloração das frações hexano e diclorometano das folhas já era esverdeada. Porém, pelas reações com ácido sulfúrico e vanilina a presença de tais substâncias pôde ser confirmada. Além disso, a fração hexano do extrato da casca apresentou reação positiva para o teste com ácido sulfúrico e vanilina.

A presença de heterosídeos antraquinônicos foi testada para todas as frações do extrato, mas apenas a fração acetato de etila do extrato das folhas foi indicativa da presença de heterosídeos antraquinônicos.

A pesquisa para esteróides e triterpenos indicou reação positiva para todas as frações de ambos os extratos. As frações hexano e diclorometano de ambos os extratos apresentaram coloração avermelhada indicando a presença da função carbonila na posição 3 e duplo enlace em 5 e 6. Já as frações acetato de etila e hidroalcoólica de ambos os extratos apresentaram coloração amarelada, indicando a presença de metila em C<sub>14</sub>. Os resultados obtidos foram diferentes de Silva *ET AL.* (2012), pois este, havia encontrado triterpenos e esteroides apenas nas folhas, utilizando o método de CCD.

A reação de Keller Kelliani foi indicativa de triterpenos nas frações hexano, diclorometano e acetato de etila do extrato das folhas. A fração hexano das cascas apresentou coloração vermelha, indicando a presença de esteróides com carbonila.

Os ensaios com o extrato aquoso foram realizados, e os resultados obtidos encontram-se dispostos no quadro 8.

A reação para taninos foi positiva para o caule e a folha. Na reação com cloreto férrico observou-se, através da coloração formada, a presença de taninos condensados na casca e taninos hidrolisáveis na folha. Já a reação formol clorídrico foi positiva para ambos os extratos nas duas etapas, ou seja, os extratos das folhas e das cascas possuem os dois tipos de taninos, hidrolisáveis e condensados. A reação de aminogrupos foi positiva para ambos os extratos. A reação para ácidos

fixos foi positiva para ambos os extratos. A reação para gomas e mucilagens foi positiva para ambos os extratos.

Teste	Casca	Folhas
Heterosídeos antociânicos	-	-
Heterosídeos saponínicos	-	-
Heterosídeos cianogenéticos	-	-
Taninos	Verde	Cinza azulado
a. Cloreto férrico		
b. Formol clorídrico	+ hidrolisáveis + condensados	+ hidrolisáveis + condensados
Aminogrupos	+	+
Ácidos fixos	+	+
Ácidos voláteis	-	-
Gomas e mucilagens	+	+

QUADRO 8 - RESULTADOS DA MARCHA FITOQUÍMICA COM O EXTRATO AQUOSO  
FONTE: A autora (2013)

Os resultados obtidos foram ligeiramente diferentes dos obtidos por SILVA e colaboradores (2011 e 2012), visto que aqui, os taninos hidrolisáveis e condensados foram detectados para folhas e cascas. A presença de taninos hidrolisáveis e seus precursores, como o ácido elágico, foi confirmada pelo isolamento das substâncias descritas nas próximas páginas.

#### 4.3.1 Marcha sistemática fitoquímica e possíveis atividades biológicas da planta

Após a marcha sistemática fitoquímica, uma triagem dos metabólitos secundários presentes na espécie, pôde-se saber qualitativamente, quais as classes de compostos presentes em *Sapium glandulosum*. A partir do conhecimento de tais classes de compostos pode-se pensar em possíveis aplicações para a planta e suas prováveis atividades biológicas. Os flavonóides, por exemplo, são bons antioxidantes e podem ter aplicação na indústria e também atividades farmacológicas.

#### 4.4 RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS POR SOXHLET

Para obter o extrato das folhas, partiu-se de 1200 g de folhas secas para obter 430 mL de extrato concentrado.

A obtenção do extrato da casca de *Sapium glandulosum* partiu de 1600 g de planta para obter um volume de 215 mL de extrato concentrado.

Os respectivos extratos concentrados foram submetidos ao ensaio para determinação do peso seco.

A tabela abaixo demonstra os valores de peso seco dos extratos brutos da casca e da folha de *Sapium glandulosum*:

TABELA 3 - PESO SECO DOS EXTRATOS BRUTOS DAS PARTES DE *Sapium glandulosum*

	Peso placa	Placa + extr.	Extrato	Média
<b>Folha</b>	33,6658	33,8961	0,2303	0,2310
<b>Folha</b>	32,8381	33,0698	0,2317	
<b>Folha</b>	-	-	-	
<b>Casca</b>	47,1268	47,3646	0,2378	0,2304
<b>Casca</b>	30,9098	31,1351	0,2253	
<b>Casca</b>	43,8131	44,0412	0,2281	

FONTE: A autora (2013)

A partir destes dados chegou-se a um rendimento de 8,28% para o extrato bruto da folha, enquanto que o rendimento obtido na extração da casca foi de 3,10%.

Através destes cálculos, foi obtido o número que representa os sólidos totais presentes no extrato todo. O extrato das folhas apresentou 99,33 g de sólidos totais e o extrato das cascas apresentou 49,53 g de sólidos totais.

#### 4.5 FRAÇÕES OBTIDAS PELO SISTEMA DE PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Após o particionamento foram obtidos os seguintes extratos secos com as seguintes quantidades:

TABELA 4 - PESO DAS FRAÇÕES

Extrato		Peso (g)	Rendimento (%)
Folha	Bruto	17,9302	8,28
	Hexano	10,2417	0,85
	Clorofórmio	8,5620	0,71
	Acetato de Etila	15,5516	1,30
	Hidroalcoólico	34,1941	2,85
Casca	Bruto	-	3,096
	Hexano	4,6638	0,29
	Clorofórmio	6,9889	0,44
	Acetato de Etila	1,5991	0,10
	Hidroalcoólico	14,0175	0,88

FONTE: A autora (2013)

Ao observar-se a tabela 4, nota-se que a fração de maior rendimento foi a hidroalcoólica em ambos os casos (folhas e cascas). Os rendimentos foram calculados com base na quantidade total de material vegetal seco e pulverizado utilizado para a extração.

#### 4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS

O composto FOCAM1 foi obtido após a lavagem com água do resíduo da filtragem do extrato bruto da casca. Houve a precipitação de aproximadamente 120 mg do referido composto, que foi filtrado e seco.

Após a realização da coluna cromatográfica da fração clorofórmio folha, verificou-se por cromatografia em camada delgada que os frascos 17 a 45 eram semelhantes. Utilizando metanol como solvente os frascos foram unidos e em seguida ocorreu a precipitação de aproximadamente 22 mg do composto FOCAM2. Para separar este precipitado foi utilizado o método de centrifugação.

O composto FOCAM3 foi obtido pela precipitação da fração acetato de etila folha, após a adição de metanol para solubilizar o que estava seco. Foram obtidos por centrifugação aproximadamente 8 mg do isolado.

Também da coluna da fração acetato de etila folha foram isolados 11 mg do composto FOCAM4, o isolado estava no frasco de número 11. Após cromatografia

em camada delgada verificou-se uma mancha única. O composto tinha coloração amarela.

Da união dos frascos 13 a 26, foi adicionado uma solução de metanol e água (70:30) e ocorreu a precipitação de aproximadamente 23 mg de um composto que foi chamado de FOCAM5.

Também da fração acetato de etila, após análise por cromatografia em camada delgada, foram unidos os frascos de número 35 a 43. Foi realizada uma cromatografia em coluna a vácuo, com fase móvel acetato de etila:diclorometano (8:2) porém os frascos ainda não foram analisados.

#### 4.6.1 O isolado FOCAM1

A amostra denominada FOCAM1 foi obtida após a lavagem com água do resíduo da filtragem do extrato bruto da casca. Houve a precipitação de aproximadamente 120 mg de um pó branco, que foi filtrado e seco para posterior análise por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , incluindo os experimentos bidimensionais HSQC e HMBC.

Até o momento foram realizados apenas os experimentos unidimensionais de ressonância magnética nuclear. São necessários os experimentos bidimensionais HSQC e HMBC para definir a estrutura molecular do composto.

Porém, a presença de fluorescência azul e odor cítrico da amostra são indicativos de cumarina. Mais estudos serão realizados para chegar à confirmação da estrutura final.

#### 4.6.2 O isolado FOCAM2

Após a realização da coluna cromatográfica da fração clorofórmio folha, verificou-se por cromatografia em camada delgada que os frascos 17 a 45 eram semelhantes. Utilizando metanol como solvente os frascos foram unidos e em

seguida ocorreu a precipitação de aproximadamente 22 mg do composto FOCAM2. Para separar este precipitado foi utilizado o método de centrifugação.

Esta substância, ainda está em processo de identificação, que será finalizada em estudos posteriores.

#### 4.6.3 O isolado FOCAM3

O composto FOCAM3 foi obtido pela precipitação da fração acetato de etila folha, após a adição de metanol para solubilizar o que estava seco. Foram obtidos por centrifugação aproximadamente 8 mg do isolado. Este composto, igualmente, necessitará de estudos posteriores.

#### 4.6.4 O isolado FOCAM4

Também da coluna da fração acetato de etila folha foram isolados 11 mg do composto FOCAM4, o isolado estava no frasco de número 11. Após cromatografia em camada delgada verificou-se uma mancha única. O composto tinha coloração amarela e após análise por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foi identificado como sendo o flavonóide quercetina. Foram obtidos os espectros de acordo com o que mostram as figuras abaixo.

O experimento de RMN- $^1\text{H}$  demonstrou um singleto na região de 12,48ppm, indicando a presença de um OH no carbono 5, formando ponte de hidrogênio com a carbonila do carbono 4. Além disso, a presença de dois dubletos em  $\delta$  6,19 e  $\delta$  6,41 com constante de acoplamento de  $J=2,0$  indica a presença de dois hidrogênios aromáticos com acoplamento meta. Na região de  $\delta$  6,89 observa-se a presença de um dubleto com constante de acoplamento de  $J=8,5$ , indicando que este hidrogênio está em posição orto com o hidrogênio em  $\delta$  7,55, um duplo dubleto com constantes de acoplamento  $J=8,5$  e  $J=1,8$ . A outra constante de acoplamento deste hidrogênio, em  $J=1,8$  mostra que há um acoplamento com outro hidrogênio na posição meta, o

hidrogênio em  $\delta 7,68$  é um dubleto com  $J=1,8$ . Os demais sinais presentes no espectro indicam o solvente utilizado (DMSO- $d_6$ ), água e impurezas da amostra.

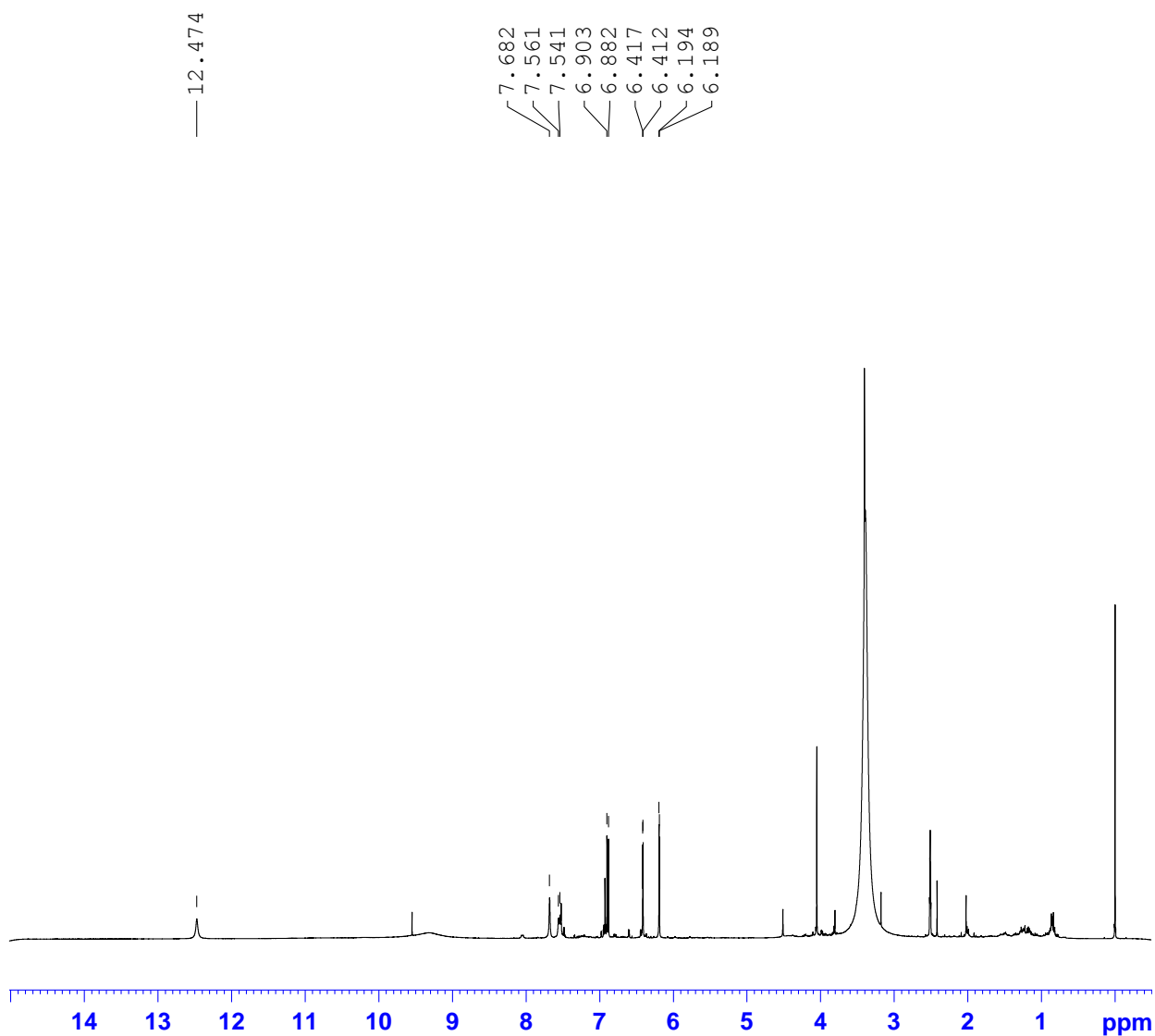


FIGURA 13 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA FOCAM4 (400MHz, DMSO –  $d_6$ )

O espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  indica a presença de 15 carbonos, igualmente à estrutura de um flavonóide. Foi realizado o experimento deixando a amostra *overnight* no equipamento.



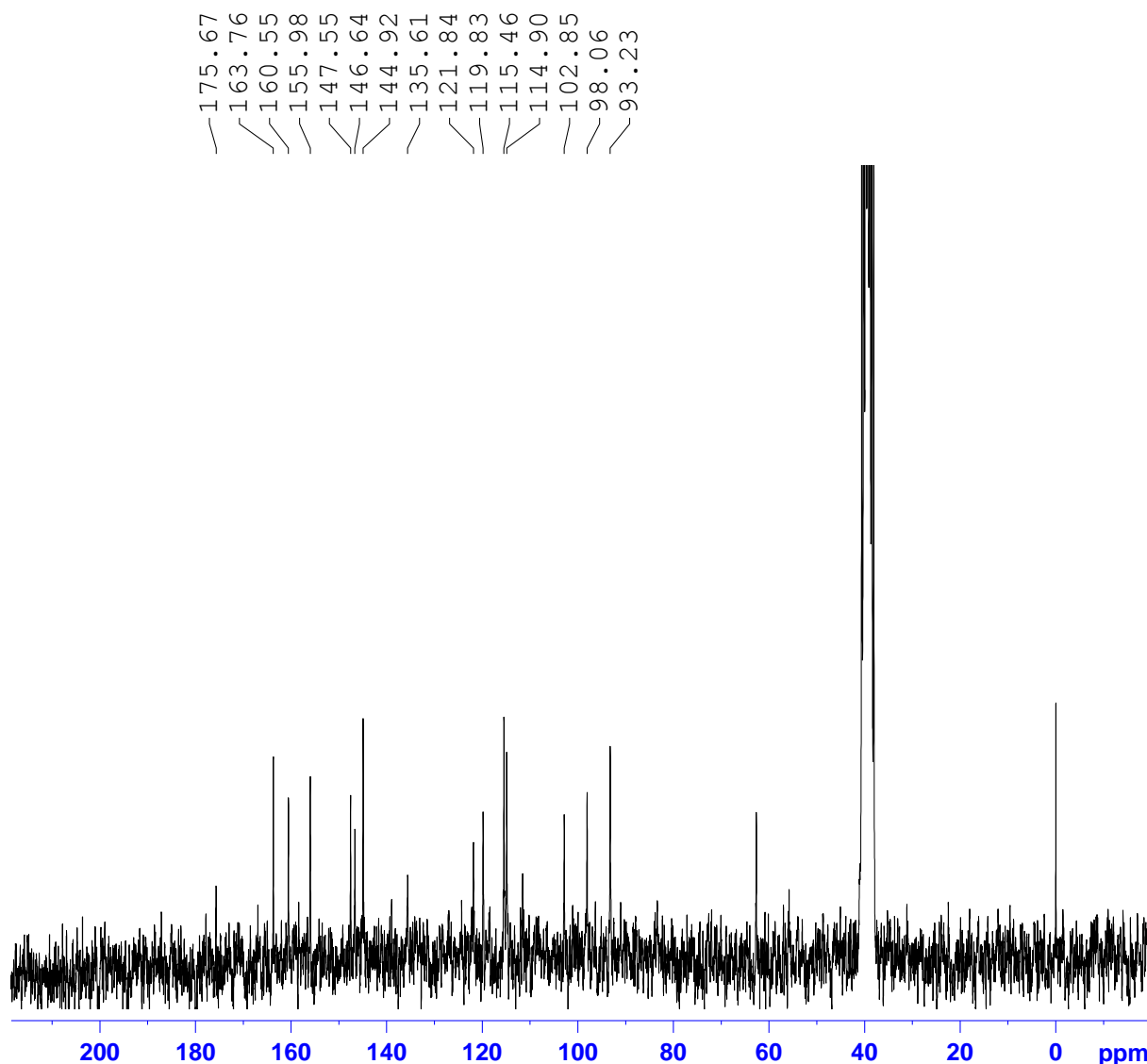


FIGURA 14 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA FOCAM4 (200MHz, DMSO – d6)

O experimento de HSQC evidencia as ligações diretas entre hidrogênios e carbonos de uma molécula. Abaixo demonstra-se o espectro obtido para este experimento para a amostra FOCAM4.

A figura 16 evidencia as correlações diretas dos hidrogênios do anel A. Pode-se observar a ligação direta entre o hidrogênio em  $\delta$  6,19 com o carbono em  $\delta$  98,1. Já o hidrogênio em  $\delta$  6,41 está ligado diretamente ao carbono  $\delta$  93,3.

O hidrogênio em  $\delta$  6,89 está diretamente ligado ao carbono  $\delta$  115,5. O hidrogênio em  $\delta$  7,55 tem correlação direta como carbono em  $\delta$  119,8, enquanto que o hidrogênio em  $\delta$  7,68 está ligado ao carbono  $\delta$  114,9.

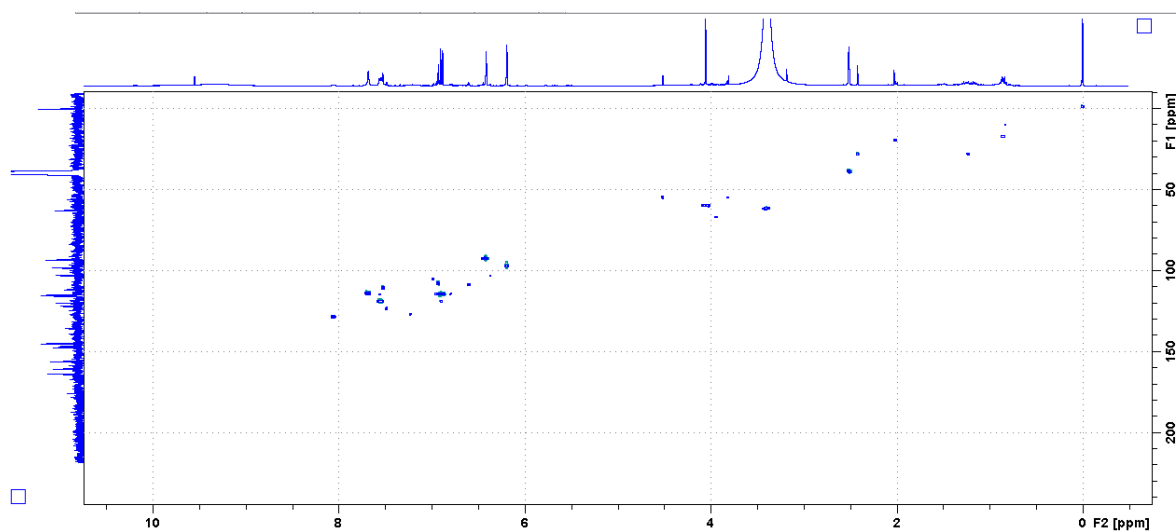


FIGURA 15 - ESPECTRO DE HSQC DA SUBSTÂNCIA FOCAM4 (400MHz, DMSO -d<sub>6</sub>)

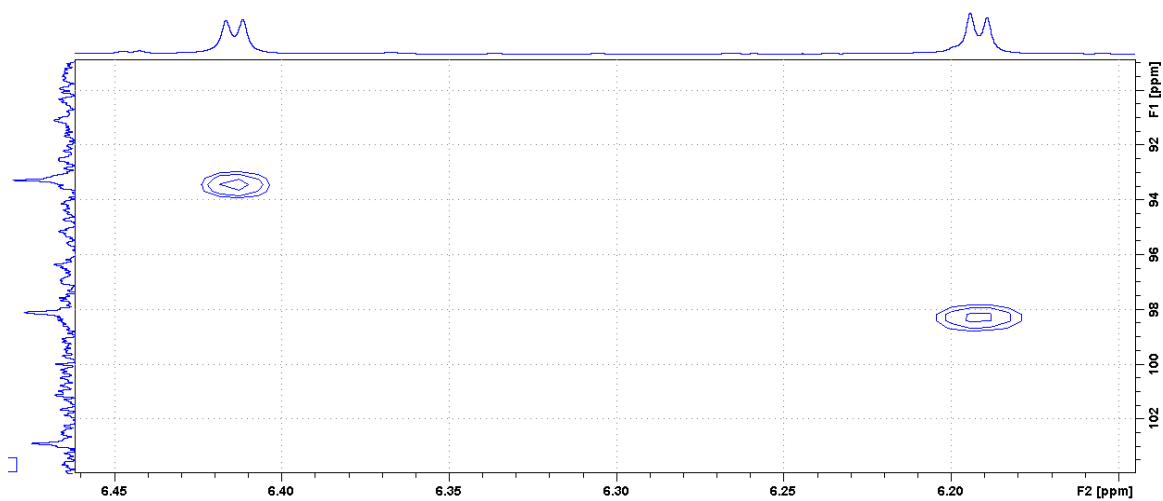


FIGURA 16 - APROXIMAÇÃO DOS HIDROGÊNIOS DO ANEL A NO ESPECTRO DE HSQC DE FOCAM4 (400MHz, DMSO -d<sub>6</sub>)

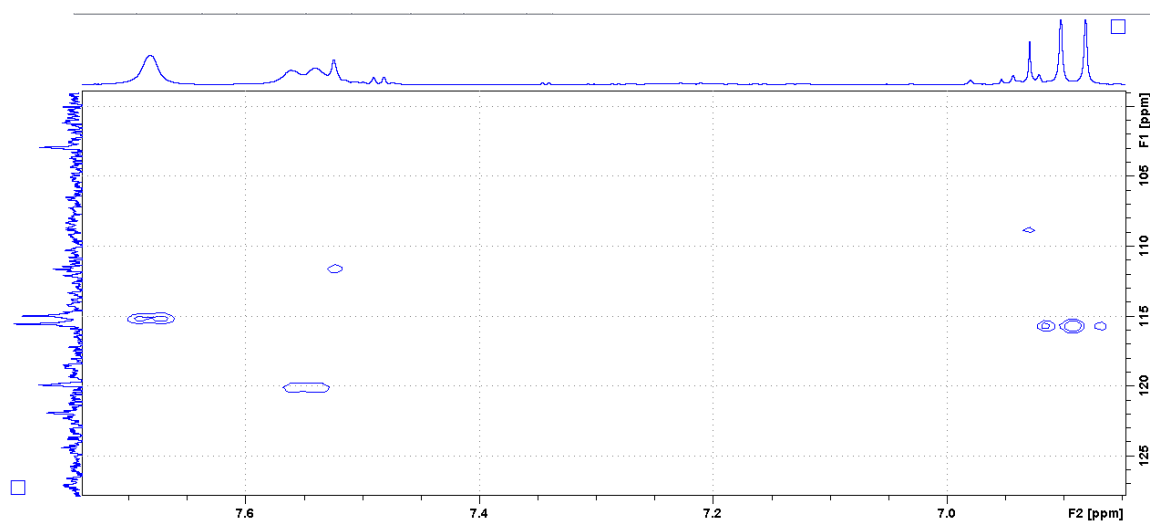


FIGURA 17 - APROXIMAÇÃO DOS HIDROGÊNIOS DO ANEL B NO ESPECTRO DE HSQC DE FOCAM4 (400MHz, DMSO -d<sub>6</sub>)

O espectro de HMBC mostra as correlações a longa distância entre hidrogênios e carbonos, ou seja, demonstra a correlação entre hidrogênios e carbonos a aproximadamente três ligações. Através deste experimento pôde-se determinar a localização dos demais carbonos na estrutura da quercetina. Nos carbonos em que não há hidrogênio foram localizadas hidroxilas, devido ao valor mais alto dos carbonos encontrados. O carbono em  $\delta$  175,9 tem valor característico de uma carbonila.

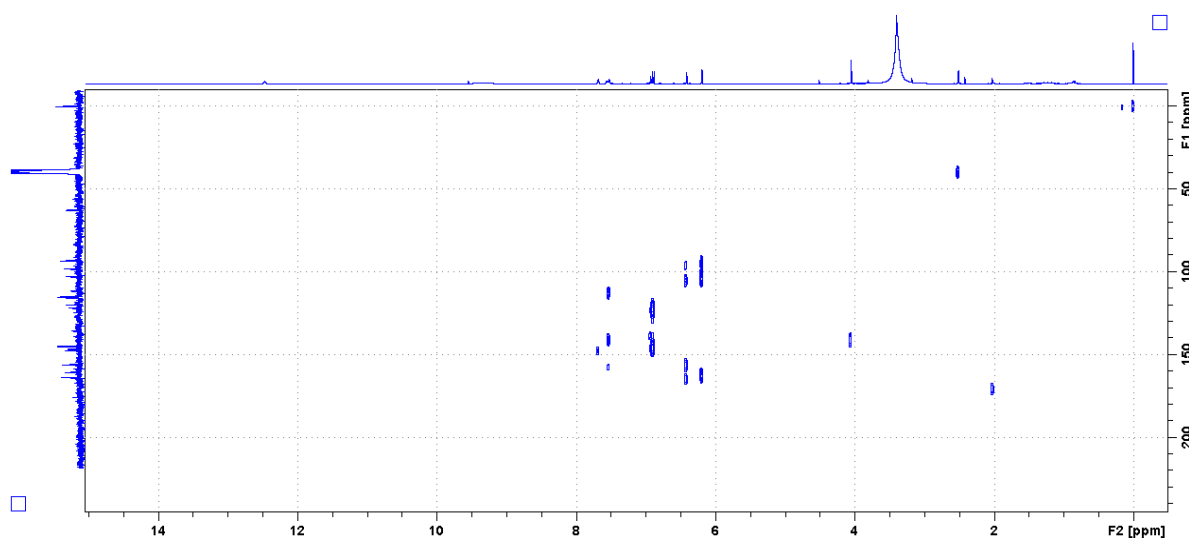


FIGURA 18 - ESPECTRO DE HMBC DE FOCAM4 (400MHz, DMSO -d6)

Os dados obtidos foram comparados com a literatura para confirmar a proposta da estrutura obtida. O quadro a seguir indica os sinais da quercetina encontrados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos da amostra FOCAM4 em comparação com dados encontrados na literatura.

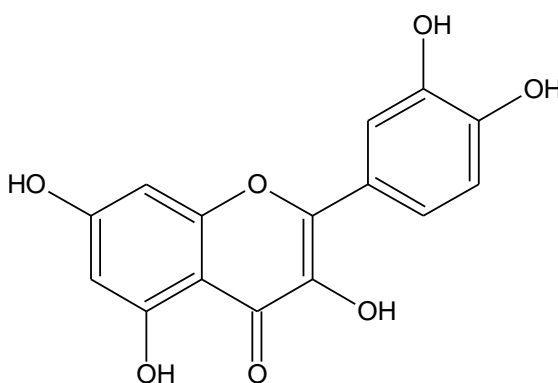


FIGURA 19 - ESTRUTURA MOLECULAR DO FLAVONÓIDE QUERCETINA  
FONTE: A autora (2013)

**TABELA 5 - COMPARAÇÃO ENTRE SINAIS DE RMN  $^{13}\text{C}$  E  $^1\text{H}$  DE FOCAM4 E LITERATURA**

C	Amostra		ANDERSEN E MARKHAM (2006)
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
2	147,5		148,0
3	135,6		137,2
4	175,9		177,3
5	160,6		162,5
6	98,1	6,19 d (J=2,0)	99,2
7	163,8		165,3
8	93,2	6,41 d (J=2,0)	94,4
9	156,0		158,2
10	102,8		104,5
1'	121,8		124,1
2'	114,9	7,68 d (J=1,8)	116,0
3'	146,6		148,8
4'	144,9		146,2
5'	115,5	6,89 d (J=8,5)	116,2
6'	119,8	7,55 dd (J=1,8; 8,5)	121,7

FONTE: A autora (2013)

A quercetina é um flavonóide, uma aglicona. Por ser um flavonóide, pode-se sugerir diversas atividades biológicas, pois flavonoides são anticarcinogênicos, antiinflamatórios, antialérgicos, antivirais, antiulcerogênicos, entre demais atividades descritas na literatura (SIMÕES *ET AL.*, 2000).

Como a quercetina já é uma substância bastante conhecida e pesquisada, pode-se pensar no uso da planta *Sapium glandulosum* como medicamento fitoterápico, desde que realizados maiores testes pré-clínicos e clínicos, que comprovem atividade e a não toxicidade dos extratos.

#### 4.6.5 O isolado FOCAM5

Da união dos frascos 13 a 26, foi adicionado uma solução de metanol e água (70:30) e ocorreu a precipitação de aproximadamente 23 mg de um composto que foi chamado de FOCAM5.

Este composto foi solubilizado em DMSO- $d_6$  e enviado para RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e DEPT. Após análise, também foram realizados os experimentos de HMBC e

HSQC. As análises de RMN bidimensionais foram realizadas em temperatura mais alta, de 40 °C.

Foi observado, de acordo com os experimentos, a presença de quatro compostos na mesma amostra (FOCAM5S1, FOCAM5S2, FOCAM5S3, FOCAM5S4), sendo que dois deles foram identificados.

O espectro de RMN-<sup>1</sup>H mostrou a presença de três singletos de diferentes tamanhos na região de aromáticos. São eles  $\delta$  7,52,  $\delta$ 7,46 e  $\delta$ 7,29. A diferença entre os tamanhos dos picos indica que se trata de hidrogênios aromáticos de diferentes moléculas. Há em  $\delta$ 4,06 um singlete que indica a presença de uma metoxila. Se realizada a comparação por tamanhos de picos, pode-se concluir que esta metoxila é parte da molécula do menor pico de hidrogênio aromático. Há também dois sinais em  $\delta$ 3,19 e  $\delta$ 2,51 que indicam a presença de dois radicais CH<sub>2</sub>. Estes dois sinais, porém, estão sobrepostos com outros picos, como, por exemplo, o DMSO, em  $\delta$  2,5.

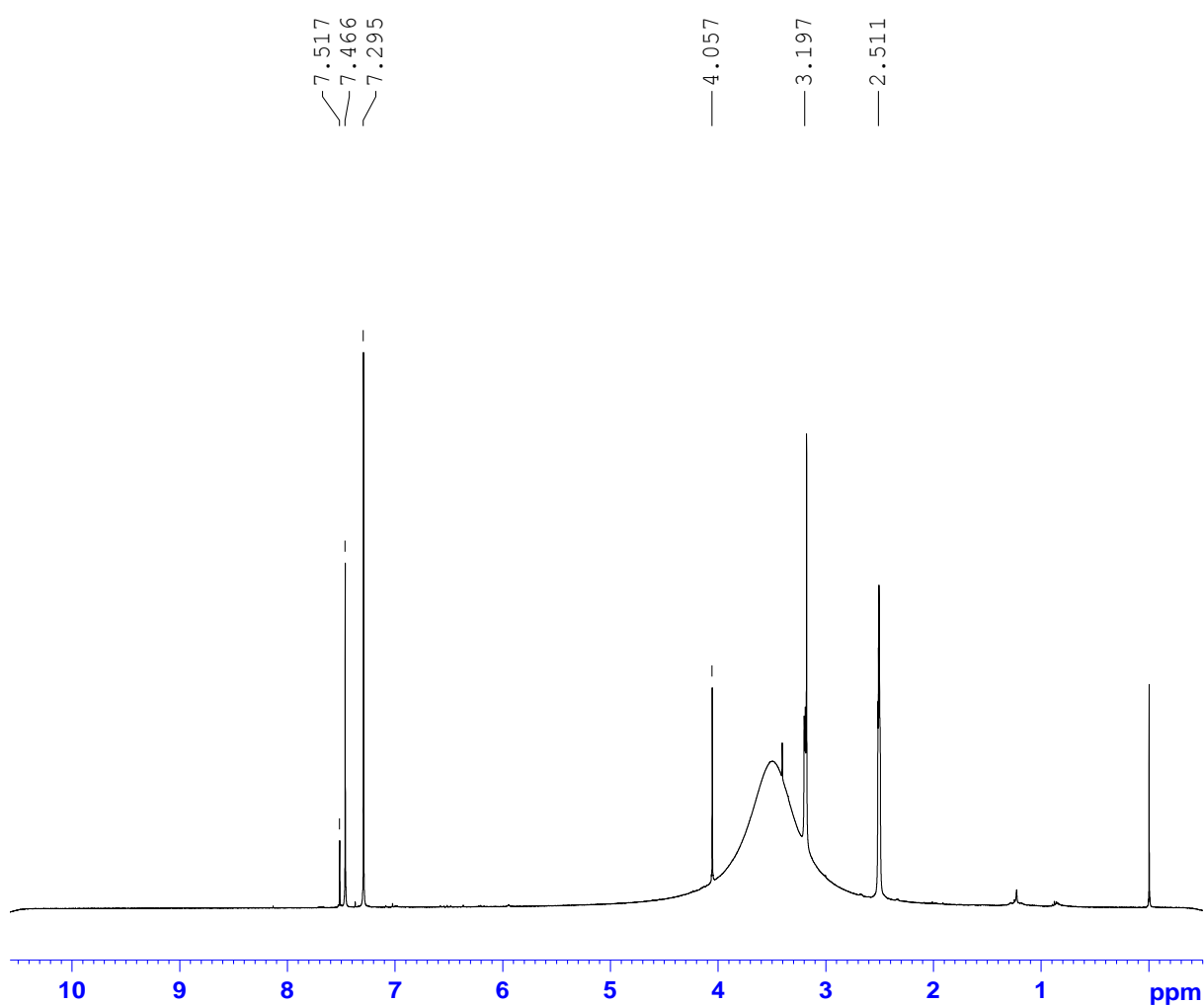


FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN-<sup>1</sup>H DA AMOSTRA FOCAM5 (400MHz, DMSO -d<sub>6</sub>, 40 °C)

A análise do espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  demonstra a presença de um número alto de carbonos, o que comprova a possibilidade da presença das três moléculas com estruturas similares. O padrão de sinais se dá com trios de picos com valores próximos entre si. Os sinais em  $\delta$  23,8 e  $\delta$  32,9 comprovam a presença de radicais  $\text{CH}_2$ . Foi também realizado DEPT para confirmar os  $\text{CH}_2$ . Um sinal em  $\delta$  195,5 indica a presença de uma carbonila, igualmente que os sinais em  $\delta$  158,2,  $\delta$  160,5 e  $\delta$  159,1.

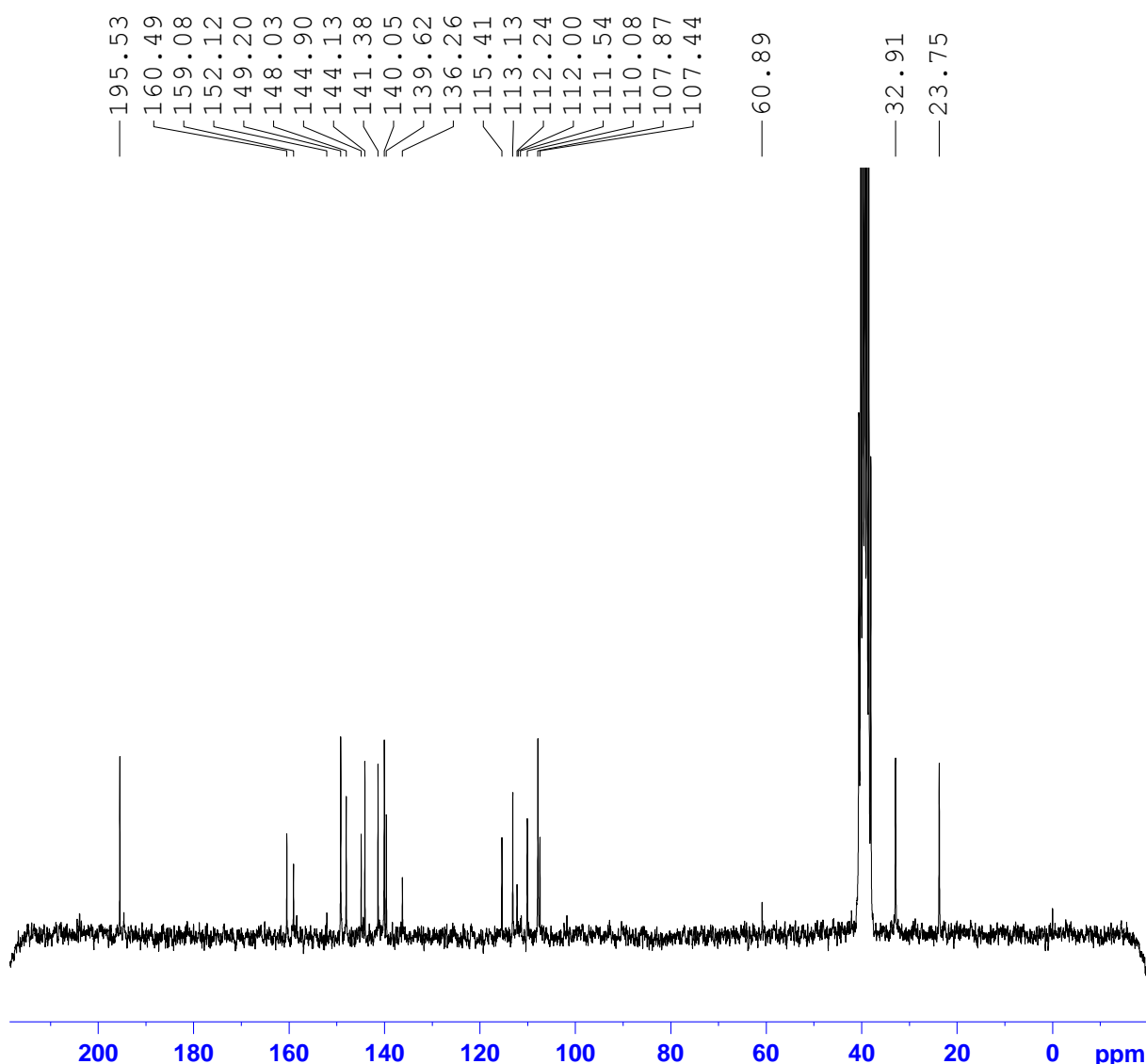


FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  DA AMOSTRA FOCAM5 (200MHz, DMSO -d6)

O experimento de HSQC, como já explicado anteriormente indica as correlações diretas entre hidrogênios e carbonos. Abaixo está representado o espectro de HSQC obtido para a amostra FOCAM5.

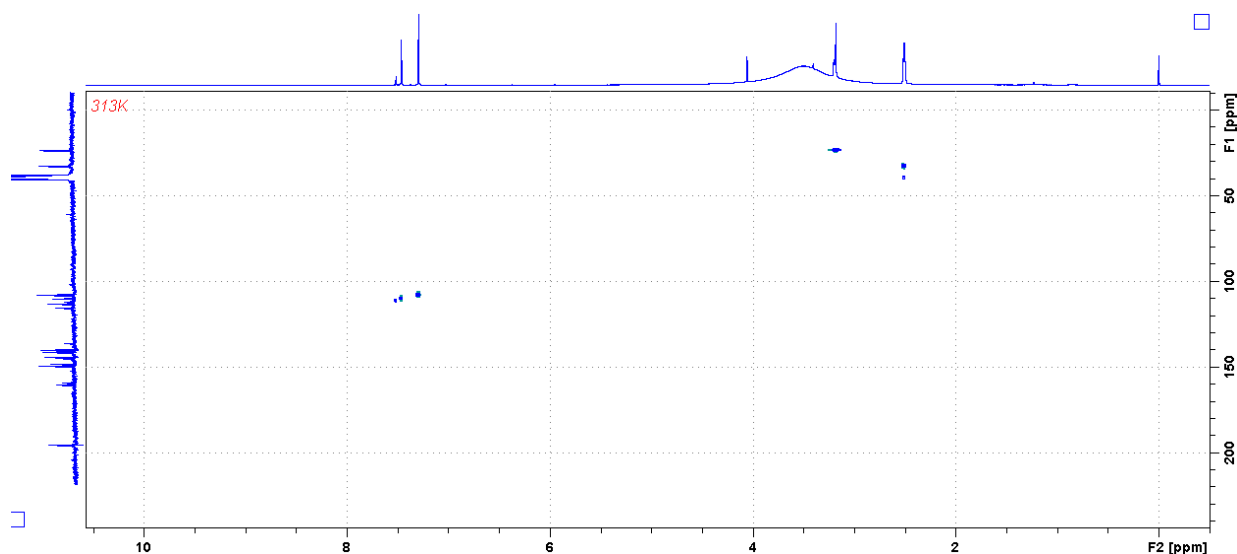


FIGURA 22 - ESPECTRO DE HSQC OBTIDO APÓS ANALISE DA AMOSTRA FOCAM5 (400MHz, DMSO -d6, 40 °C)

Observa-se na aproximação do espectro a correlação direta dos três hidrogênios aromáticos das três moléculas da mistura. O hidrogênio  $\delta$  7,52 se correlaciona diretamente com o carbono em  $\delta$  111,6. O hidrogênio em  $\delta$  7,46 está ligado ao carbono  $\delta$  110,1 enquanto que o hidrogênio  $\delta$  7,29 tem ligação direta com o carbono  $\delta$  107,9.

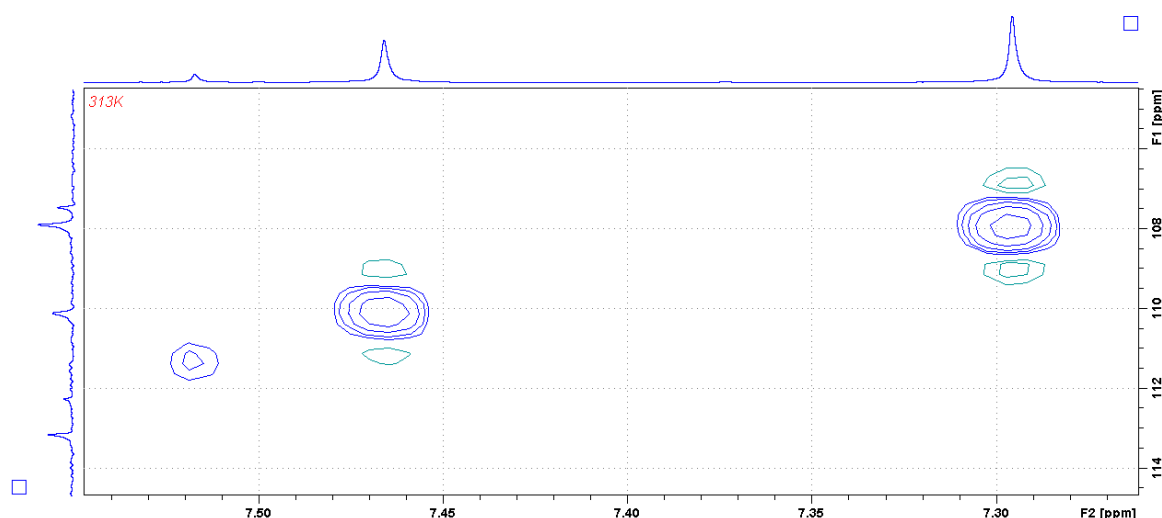


FIGURA 23 - RECORTE DO ESPECTRO DE HSQC DE FOCAM5 INDICANDO AS CORRELAÇÕES DIRETAS DOS HIDROGÊNIOS AROMÁTICOS (400MHz, DMSO -d6, 40 °C)

Os hidrogênios em  $\delta$ 3,19 e  $\delta$ 2,51, cujos sinais estão sobrepostos com outros sinais, estão diretamente ligados aos carbonos  $\delta$  23,8 e  $\delta$  32,9, respectivamente. Esta ligação direta comprova a presença de dois radicais  $\text{CH}_2$ .

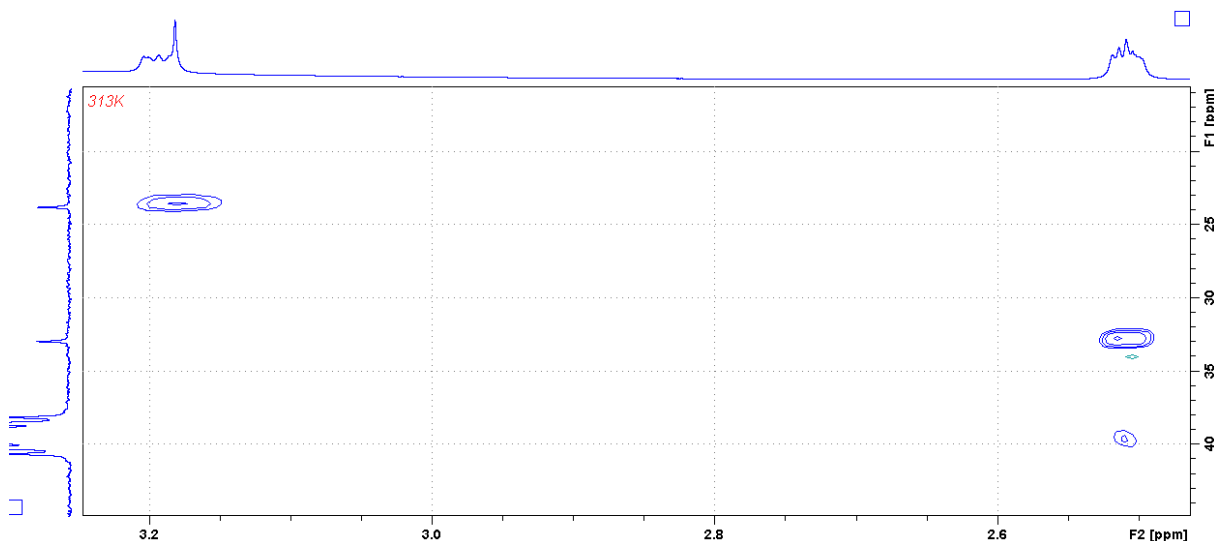


FIGURA 24 - APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HSQC, MOSTRANDO A CORRELAÇÃO DIRETA DOS HIDROGÊNIOS  $\text{CH}_2$  (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 40 °C)

A correlação a longa distância entre hidrogenios e carbonos é dada pelo experimento HMBC. O espectro de HMBC para a mistura FOCAM5 encontra-se na figura abaixo.

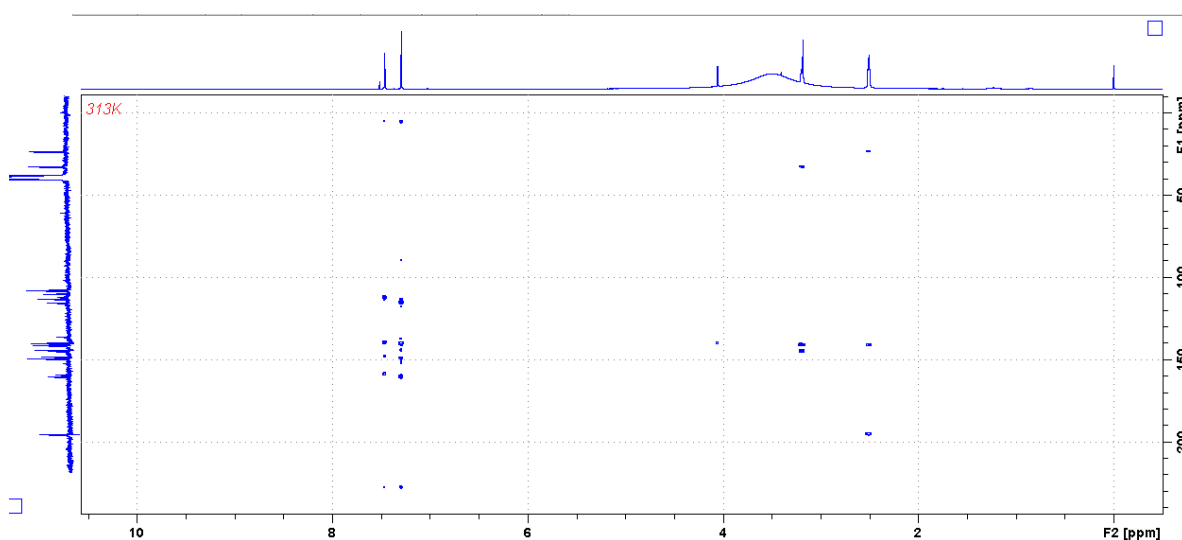


FIGURA 25 - ESPECTRO DE HMBC PARA A MISTURA FOCAM5 (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , 40 °C)



As correlações a longa distancia para os singletos dos hidrogênios aromáticos demonstram a quais carbonos cada um está correlacionado, como mostram as figuras 24 e 25.

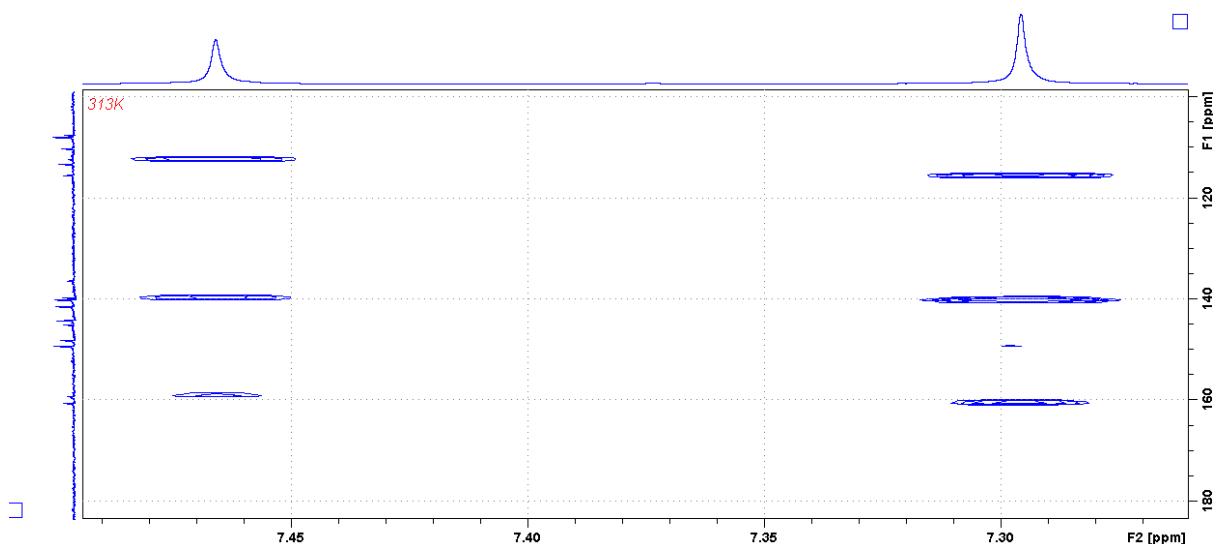


FIGURA 26 - APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HMBC, INDICANDO AS CORRELAÇÕES PARA DOIS HIDROGÊNIOS AROMÁTICOS DA MISTURA FOCAM5 (400MHz, DMSO -d<sub>6</sub>, 40 °C)

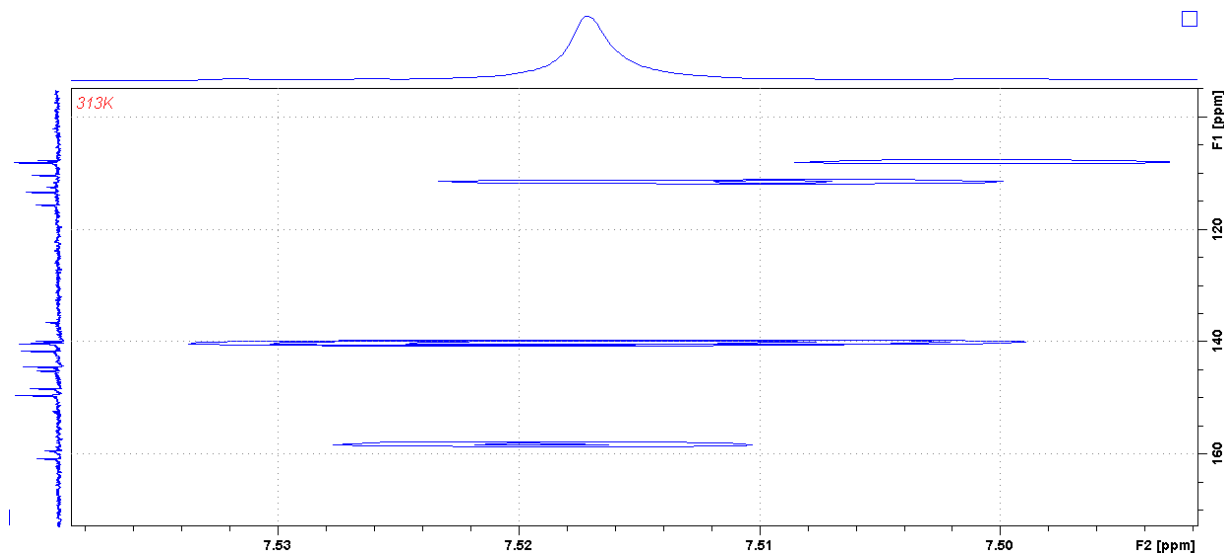


FIGURA 27 - APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HMBC, INDICANDO AS CORRELAÇÕES PARA O HIDROGÊNIO AROMÁTICO EM MENOR QUANTIDADE DA MISTURA FOCAM5 (400MHz, DMSO -d<sub>6</sub>, 40 °C)

As correlações a longa distancia para os multipletos dos hidrogênios dos grupos CH<sub>2</sub> demonstram a quais carbonos cada um está correlacionado, como mostram as figuras a seguir.

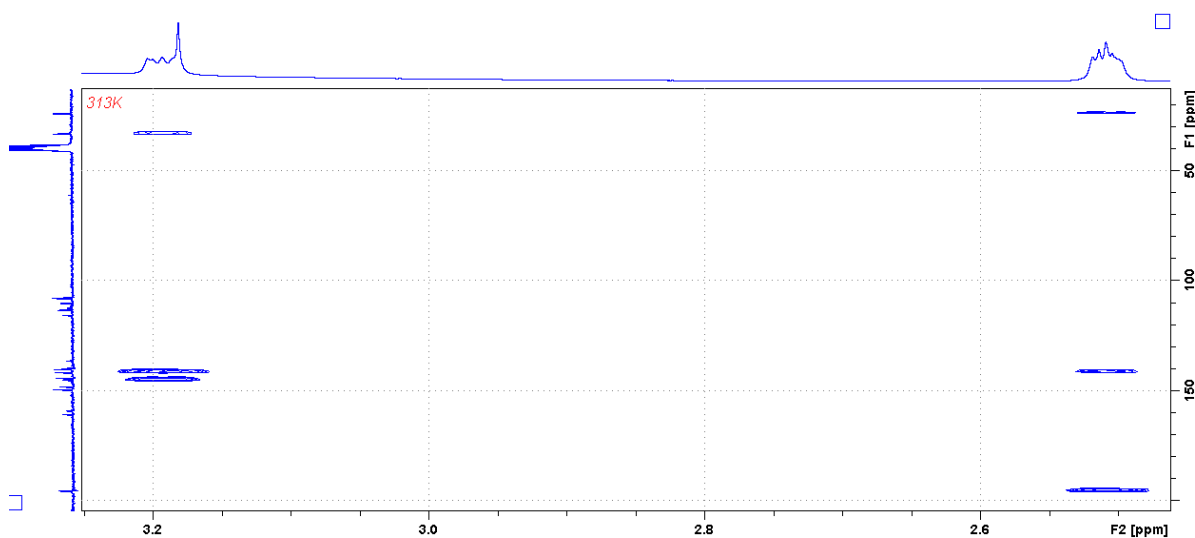


FIGURA 28 - CORRELAÇÕES A LONGA DISTÂNCIA DOS CH<sub>2</sub> PRESENTES NA AMOSTRA FOCAM5 (400MHz, DMSO -d<sub>6</sub>, 40 °C)

O fator determinante para a identificação da molécula FOCAM5S3 foi a presença desta correlação à longa distância, que relaciona o hidrogênio em  $\delta$ 4,06, da metoxila com o carbono  $\delta$  140,2.

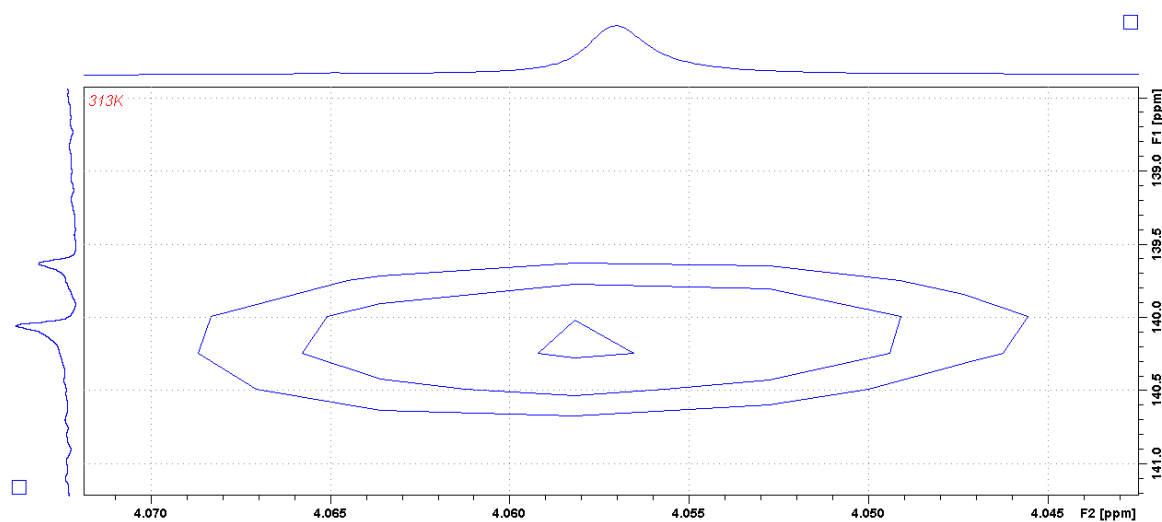


FIGURA 29 - APROXIMAÇÃO DO ESPECTRO DE HMBC DE FOCAM5, INDICANDO A CORRELAÇÃO À LONGA DISTÂNCIA DO HIDROGÊNIO DA METOXILA (400MHz, DMSO -d<sub>6</sub>, 40 °C)

Tendo em vista que a amostra FOCAM5 é uma mistura de quatro substâncias, sendo que três delas são muito semelhantes conforme mostram os sinais do espectro, em comparação com a literatura e com base na análise dos

espectros de RMN uni e bidimensionais, conseguimos identificar duas substâncias. Para a substância FOCAM5S2 foi proposta a estrutura do ácido elágico e para a substância FOCAM5S3 foi proposta a estrutura do 3,3'-di-*o*-metil ácido elágico. As estruturas químicas de ambas e as comparações com a literatura estão indicadas abaixo.

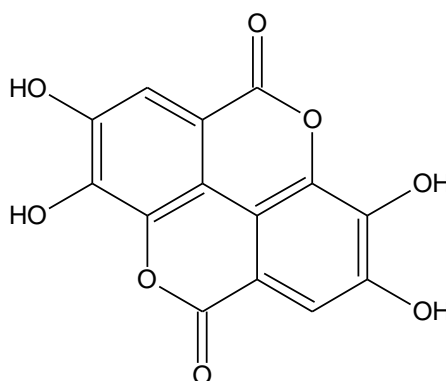


FIGURA 30 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO ELÁGICO  
FONTE: A autora (2013)

TABELA 6 - COMPARAÇÃO ENTRE SINAIS DE RMN  $^{13}\text{C}$  E  $^1\text{H}$  DE FOCAM5S2 E LITERATURA

C	Ácido Elágico			
	FOCAM5S2		Referências	
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	LI, ELSOHLY, HUFFORD E CLARK (1999)	SILVA, <i>ET AL</i> (2007)
1	112,20	7,46 s	112,20	112,4
2	136,30		136,30	136,4
3	139,60		139,40	139,7
4	148,00		148,00	148,5
5	110,10		110,20	110,2
6	107,40		107,60	107,5
7	159,10		159,00	159,2
1'	112,20	7,46 s	112,20	112,4
2'	136,30		136,30	136,4
3'	139,60		139,40	139,7
4'	148,00		148,00	148,5
5'	110,10		110,20	110,2
6'	107,40		107,60	107,5
7'	159,10		159,00	159,2

FONTE: A autora (2013)

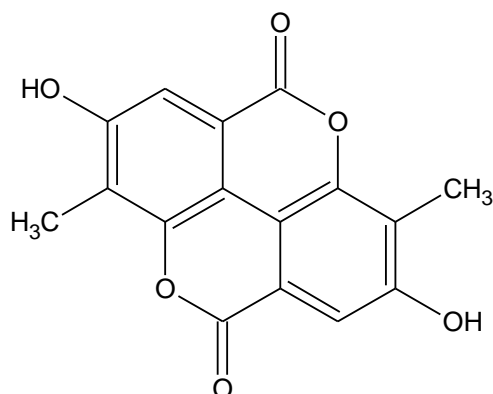


FIGURA 31 - ESTRUTURA QUÍMICA DO 3,3'-DI-O-METIL ÁCIDO ELÁGICO  
FONTE: A autora (2013)

TABELA 7 - COMPARAÇÃO ENTRE SINAIS DE RMN  $^{13}\text{C}$  E  $^1\text{H}$  DE FOCAM5S2 E LITERATURA

C	3,3'-di-o-metil ácido elagico			
	FOCAM5		SILVA, CALGAROTTO, CHAAR E MARANGONI (2008)	
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
1	111,5		111,7	
2			141,3	
3	140,2		140,18	
4	152,1		152,17	
5	111,6	7,52 s	111,49	7,52 s
6	112		112,08	
7	158,2		158,5	
3-OCH <sub>3</sub>	60,9	4,06 s	60,89	4,06 s
1'	111,5		111,7	
2'			141,3	
3'	140,2		140,18	
4'	152,1		152,17	
5'	111,6	7,52 s	111,49	7,52 s
6'	112		112,08	
7'	158,2		158,5	
3'-OCH <sub>3</sub>	60,9	4,06 s	60,89	4,06 s

FONTE: A autora (2013)

As substâncias FOCAM5S1 e FOCAM5S4 ainda não foram confirmadas e são necessários estudos adicionais, como espectrometria de massas para elucidá-las. A amostra já foi enviada para a espectrometria de massas e mais estudos serão realizados.

As substâncias identificadas comprovam o que foi encontrado na triagem realizada na marcha fitoquímica, pois havia indicativos da presença de taninos hidrolisáveis em *Sapium glandulosum*.

O ácido elágico e seu derivado metilado são considerados pseudo taninos, visto que são apenas precursores dos mesmos (SIMÕES, M.C.O., *ET AL.*, 2000).

Estas substâncias provavelmente são precursoras dos elagitaninos (EVANS, 1989).

Plantas que contém taninos são utilizadas para moléstias como diarreia, reumatismo, hipertensão arterial, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, renais e processos inflamatórios (SIMÕES, M.C.O., *ET AL.*, 2000).

Os achados neste estudo sugerem a realização de estudos pré-clínicos com a planta, já que, devido à presença de taninos, ela pode ser uma planta de potencial uso como medicamento fitoterápico. São, porém, necessários mais estudos toxicológicos, pois a família Euphorbiaceae é conhecida por seu potencial tóxico.

## 4.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 4.7.1 Formação do complexo fosfomolibdênico

Este método de análise da atividade antioxidante fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V), quando em contato com substâncias com capacidade antioxidante, levando à formação de um complexo de coloração verde entre fosfato e molibdênio (V) em pH ácido, cuja leitura é realizada a 695nm.

O ensaio da atividade antioxidante pela formação do complexo fosfomolibdênico foi realizado para todas as frações de folhas e caule, e em seguida, para cada uma delas, foi calculada a atividade antioxidante percentual em relação aos padrões Vitamina C e Rutina, considerados como 100%, como mostra a tabela a seguir.

TABELA 8 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS EM RELAÇÃO AOS PADRÕES

Amostra	AAR% - Vitamina C (%)	AAR% - Rutina (%)
Vit. C	100,000	100,000
EABF	33,897	62,255
FHF	34,461	63,291
FCF	34,336	63,061
FAF	40,038	73,533
FHAF	10,088	18,527
EABC	18,108	33,142
FHC	22,807	41,772
FCC	35,464	65,017
FAC	56,642	103,913
FHAC	5,388	9,781

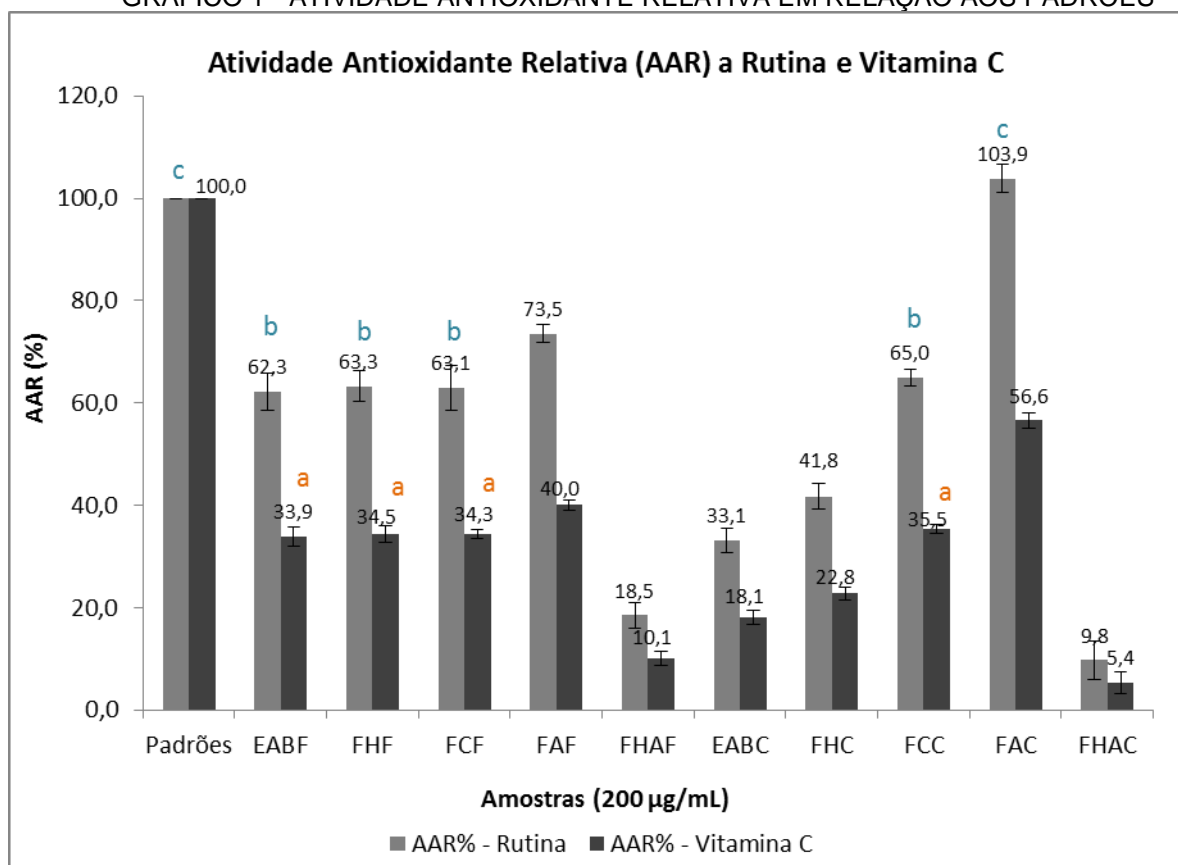
LEGENDA: EABF: Extrato Alcoólico Bruto Folha, FHF: Fração Hexano Folha, FCF: Fração Clorofórmio Folha, FAF: Fração Acetato de Etila Folha, FHAF: Fração Hidroalcoólica Folha, EABC: Extrato Alcoólico Bruto Casca, FHC: Fração Hexano Casca, FCC: Fração Clorofórmio Casca, FAC: Fração Acetato de Etila Casca, FHAC: Fração Hidroalcoólica Casca.

A mais efetiva atividade antioxidante encontrada neste teste foi a da fração acetato de etila da casca, que apresentou uma atividade antioxidante superior, mas estatisticamente igual, à do padrão rutina. Já a fração acetato de etila das folhas de *Sapium glandulosum* apresentaram atividade antioxidante relativa de 40,0% em relação ao padrão vitamina C e de 73,5% em relação à rutina.

Outras amostras com boa atividade foram o extrato bruto, hexano e clorofórmio das folhas da planta, além da fração clorofórmio da casca, todas demonstram atividade antioxidante relativa acima de 50% em comparação com o padrão rutina.

Para verificar diferença estatística entre as amostras aplicou-se Anova, e para localização das diferenças o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

GRÁFICO 1 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA EM RELAÇÃO AOS PADRÕES



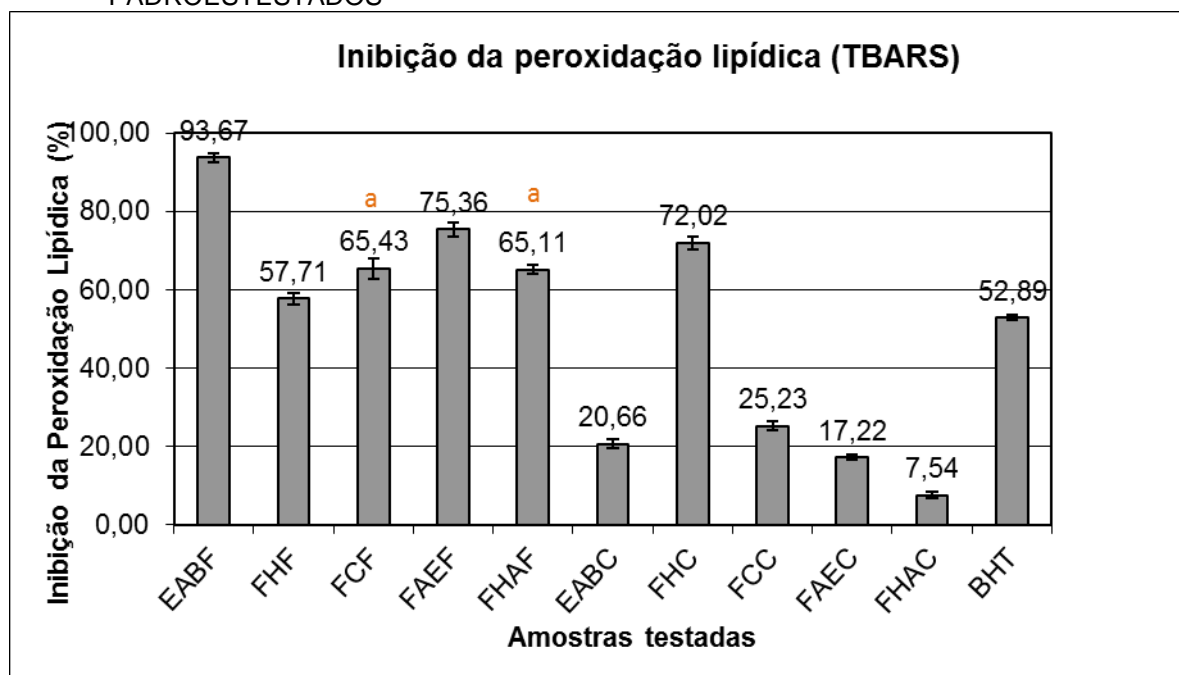
LEGENDA: EABF: Extrato Alcoólico Bruto Folha, FHF: Fração Hexano Folha, FCF: Fração Clorofórmio Folha, FAF: Fração Acetato de Etila Folha, FHAF: Fração Hidroalcoólica Folha, EABC: Extrato Alcoólico Bruto Casca, FHC: Fração Hexano Casca, FCC: Fração Clorofórmio Casca, FAC: Fração Acetato de Etila Casca, FHAC: Fração Hidroalcoólica Casca.

#### 4.7.2 Teste com espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A oxidação de lipídeos pelo ataque de radicais livres ou agentes oxidantes forma o malondialdeído (MDA), que reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) sob alta temperatura e baixo pH, quantificando, indiretamente, a quantidade de lipídeos oxidados. Este teste é utilizado para verificar a capacidade das amostras testadas em inibir a peroxidação lipídica induzida por um agente oxidante (LIU *ET AL.*, 1997; MORAIS *ET AL.*, 2006).

O gráfico a seguir mostra os resultados obtidos pelo teste. Espera-se uma maior atividade antioxidante nas amostras com caráter mais lipofílico, uma vez que o teste verifica a capacidade de inibição da peroxidação lipídica.

GRÁFICO 2 – INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (TBARS) (%) DAS AMOSTRAS E PADRÃO TESTADOS



LEGENDA: EABF: Extrato Alcoólico Bruto Folha, FHF: Fração Hexano Folha, FCF: Fração Clorofórmio Folha, FAF: Fração Acetato de Etila Folha, FHAF: Fração Hidroalcoólica Folha, EABC: Extrato Alcoólico Bruto Casca, FHC: Fração Hexano Casca, FCC: Fração Clorofórmio Casca, FAC: Fração Acetato de Etila Casca, FHAC: Fração Hidroalcoólica Casca.

As amostras foram analisadas em comparação com o padrão de referência BHT, pois este tem característica mais lipofílica e é utilizado industrialmente como conservante. O extrato bruto da folha e suas frações apresentaram atividade superior ao BHT. O extrato bruto e a fração acetato de etila da folha demonstraram uma atividade bastante efetiva de inibição da peroxidação lipídica. Isto sugere que pode haver outras possíveis moléculas neste extrato e fração corroborando para esta atividade tão expressiva.

Já as frações obtidas das cascas seguiram o padrão esperado para esta análise, uma vez que a fração que apresentou inibição mais significativa da peroxidação lipídica foi a fração hexano, a mais lipossolúvel.

Os resultados obtidos foram muito satisfatórios, pois indicam que a planta *Sapium glandulosum* inibe consideravelmente a peroxidação lipídica.



#### 4.7.3 Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

A molécula do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila é um radical livre e estável, pois possui um elétron sobressalente ao longo da molécula como um todo, o qual não dimeriza, o que normalmente ocorre com os demais radicais livres. A molécula apresenta cor violeta intensa. Porém, quando a solução entra em contato com uma substância doadora de hidrogênio, o radical passa à sua forma reduzida, e assume coloração amarela pálida. (MOLYNEUX, 2004).

A porcentagem de inibição do DPPH foi calculada para cada amostra testada e, por regressão linear, foi possível calcular o  $CI_{50}$ , ou seja, a concentração da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH. Cada amostra foi comparada aos padrões vitamina C e rutina. Abaixo se encontram os gráficos com as retas obtidas a partir das médias das porcentagens de inibição do DPPH para cada amostra testada.

Os resultados de  $CI_{50}$  estão dispostos na tabela 9, os quais correspondem às médias de três repetições  $\pm$  desvio padrão. Para verificar diferença estatística entre as amostras aplicou-se Anova, e para localização das diferenças o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

TABELA 9 - RESULTADO DE  $CI_{50}$  E DESVIO PADRÃO PARA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH

	IC50 $\mu\text{g/mL}$ )	DP
Vitamina C	4,5036	0,0508
Rutina	7,3307	0,1169
EABC	23,4475	0,6003
FHC	405,8344	1,4558
FCC	18,3898	0,4385
FAC	72,3840	0,4740
EABF	27,1441	0,2733
FHF	120,4152	1,5609
FCF	18,8119	0,3269
FAF	47,7821	1,0200

LEGENDA: EABF: Extrato Alcoólico Bruto Folha, FHF: Fração Hexano Folha, FCF: Fração Clorofórmio Folha, FAF: Fração Acetato de Etila Folha, EABC: Extrato Alcoólico Bruto Casca, FHC: Fração Hexano Casca, FCC: Fração Clorofórmio Casca, FAC: Fração Acetato de Etila Casca.

GRÁFICO 3 - CURVA DA REDUÇÃO DE DPPH EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS PADRÕES E AMOSTRAS

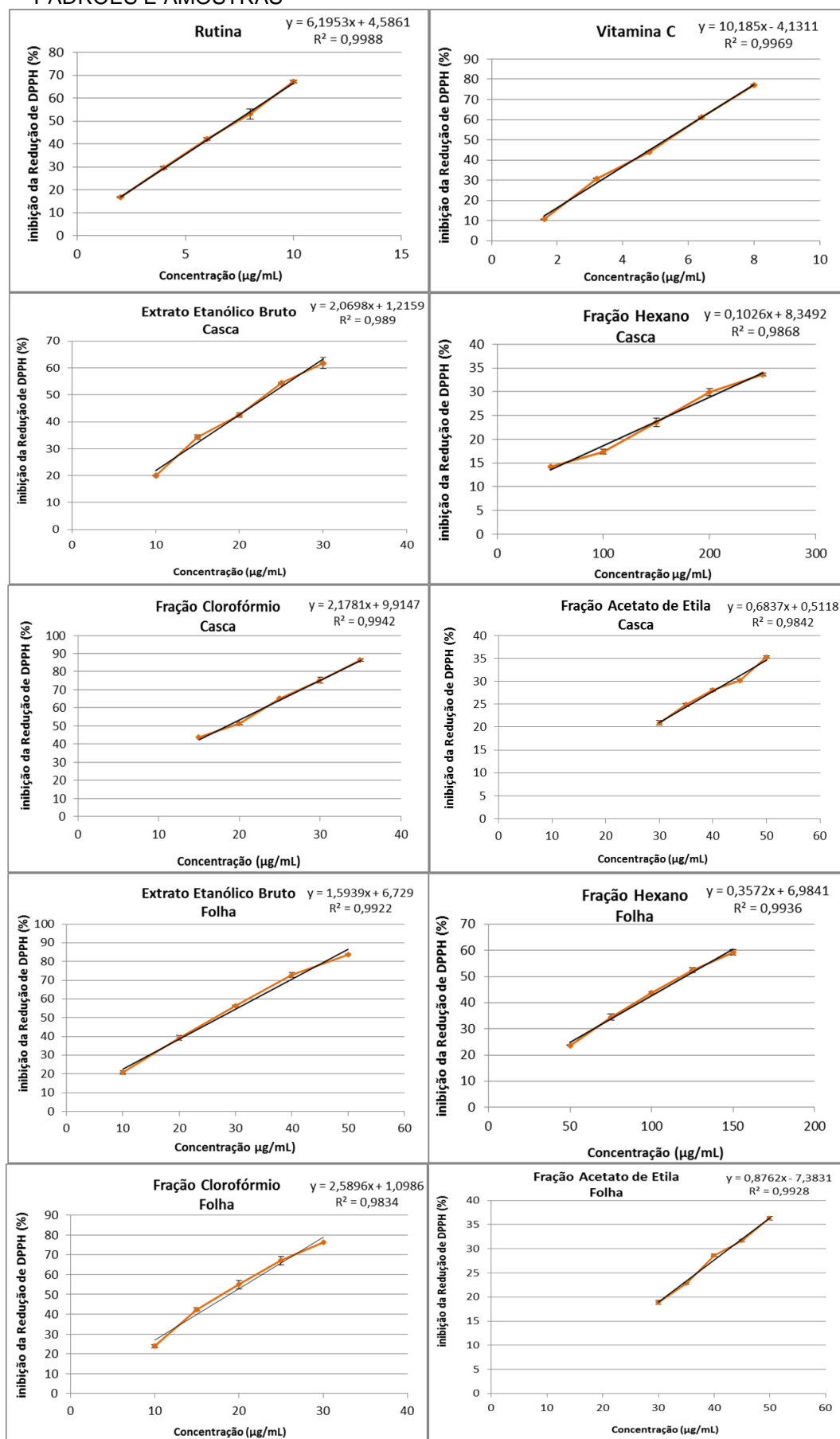
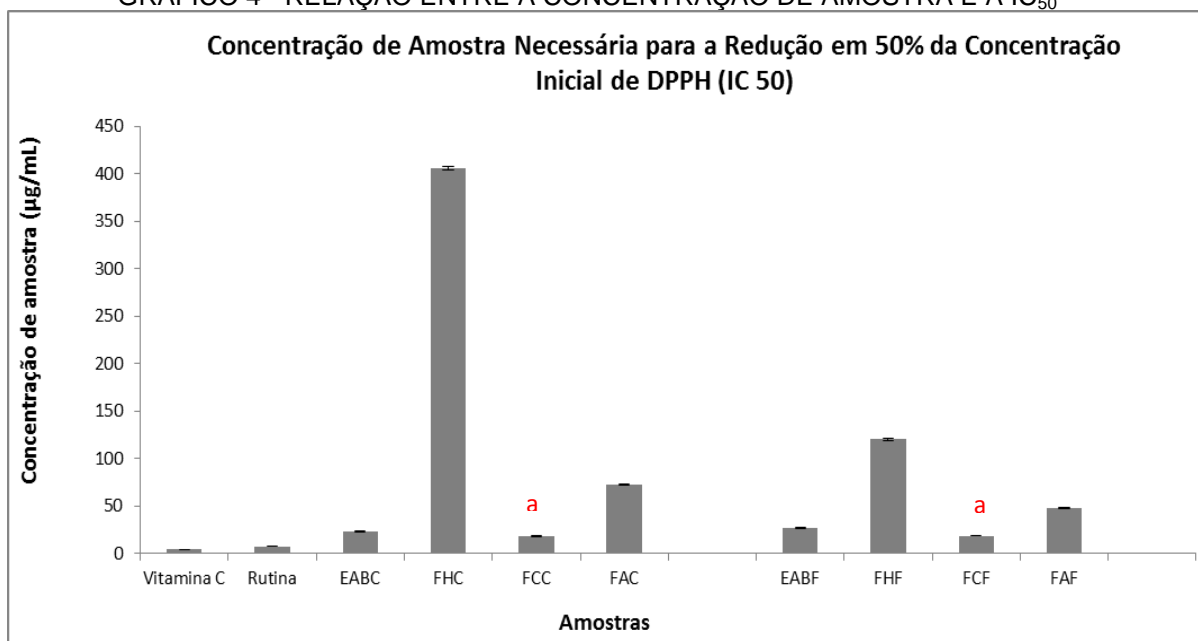


GRÁFICO 4 - RELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE AMOSTRA E A IC<sub>50</sub>

LEGENDA: EABF: Extrato Alcoólico Bruto Folha, FHF: Fração Hexano Folha, FCF: Fração Clorofórmio Folha, FAF: Fração Acetato de Etila Folha, EABC: Extrato Alcoólico Bruto Casca, FHC: Fração Hexano Casca, FCC: Fração Clorofórmio Casca, FAC: Fração Acetato de Etila Casca.

A análise dos dados permite observar que as atividades antioxidantes mais significativas ocorreram nas frações clorofórmio das folhas e cascas, atividades estas que podem ser consideradas iguais estatisticamente pelo teste de Tukey. Em contrapartida, as frações com menor potencial antioxidante do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila são ambas as frações hexano, pois estas necessitam de uma grande quantidade de material para produzir o efeito antioxidante. A análise demonstra, ainda, que os padrões vitamina C e rutina possuem atividade consideravelmente superior às apresentadas pelas amostras de *Sapium glandulosum*.

Os resultados obtidos, se comparados aos obtidos por SILVA ET AL. (2011), para este método, estão de acordo, pois as atividades obtidas pelo autor não foram consideradas significativas.

A atividade antioxidante mais expressiva entre os testes realizados foi obtida pelo teste de TBARS, uma vez que os resultados mostraram atividade antioxidante superior ao padrão para várias amostras

#### 4.8 ANÁLISE DA ATIVIDADE SOBRE *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* foi realizado para o Extrato bruto das folhas e casca, e para todas as frações dele obtidas, e o resultado obtido encontra-se na tabela abaixo.

TABELA 10 - MORTALIDADE DE *Artemia salina* E DL50

Amostra	Mortalidade / concentração			LC 50 (µg/mL)	Intervalo de confiança 95% (µg/mL)
	10 (µg/mL)	100 (µg/mL)	1000 (µg/mL)		
EABF	2	3	2	> 1000	-
FHF	1	3	7	> 1000	-
FCF	3	2	4	> 1000	-
FAF	5	4	7	> 1000	-
FHAF	1	2	1	> 1000	-
EABC	2	0	4	> 1000	-
FHC	1	4	5	> 1000	-
FCC	0	7	5	> 1000	-
FAC	4	4	6	> 1000	-
FHAC	0	2	0	> 1000	-
Padrão Sulfato de quinidina	3	26	85	177,38	136,85 - 229,93

LEGENDA: EABF: Extrato Alcoólico Bruto Folha, FHF: Fração Hexano Folha, FCF: Fração Clorofórmio Folha, FAF: Fração Acetato de Etila Folha, FHAF: Fração Hidroalcoólica Folha, EABC: Extrato Alcoólico Bruto Casca, FHC: Fração Hexano Casca, FCC: Fração Clorofórmio Casca, FAC: Fração Acetato de Etila Casca, FHAC: Fração Hidroalcoólica Casca.

Nenhuma das amostras apresentou efeito tóxico sobre os náuplios de *Artemia salina*. Isto é um indicativo da potencial baixa toxicidade dos extratos de folhas e cascas de *S. glandulosum*, porém são necessários mais estudos de toxicidade para confirmar os resultados obtidos. O teste realizado é apenas um teste de triagem, de baixo custo e fácil execução.

Sabe-se que a família Euphorbiaceae é característica por apresentar efeitos tóxicos a seres humanos. As referências analisadas para este trabalho mostram que o látex da planta é utilizado para eliminar verrugas, atividade que pode ser devida a algum efeito citotóxico.

Contudo, as partes da planta utilizadas foram as folhas e a casca, não o látex. Então há, realmente, a possibilidade da não toxicidade dos extratos testados.

Entretanto, testes adicionais e mais específicos, como testes pré-clínicos em ratos, devem ser realizados para confirmar os resultados obtidos.

#### 4.9 ANÁLISE DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Os testes de atividade hemolítica têm sua importância como uma das avaliações relativas à toxicidade, visto que as hemácias são células do sangue e na maioria dos casos a lise de tais células não é desejável para medicamentos fitoterápicos.

##### 4.9.1 Atividade Hemolítica por difusão em ágar

Este teste foi realizado para todas as frações obtidas das folhas e cascas e nenhuma amostra apresentou atividade hemolítica. A figura 8 mostra uma das placas obtidas, com resultado negativo, sendo que o disco 1 é uma das amostras com resultado negativo. A coloração esverdeada explica-se pela coloração verde do extrato, que se difundiu pelo ágar. O disco 2 é o controle negativo (solvente metanol), indicando o padrão para não ocorrência da hemólise.



FIGURA 32 - TESTE DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA POR DIFUSÃO EM ÁGAR  
FONTE: A autora (2013)

#### 4.9.2 Atividade Hemolítica em sangue de Carneiro

Os extratos não apresentaram atividade hemolítica de acordo com este ensaio (quadro 16).

Os resultados obtidos neste teste de hemólise em sangue de carneiro confirmaram os resultados obtidos no teste de hemólise por difusão em ágar. Deste modo, pode-se dizer pelos testes realizados que os extratos nestas concentrações não apresentam atividade hemolítica. É indicada, entretanto, a realização de testes adicionais, como testes *in vivo* para confirmar os resultados obtidos.

## 5 CONCLUSÃO

Os objetivos propostos para este trabalho foram concluídos de modo satisfatório.

A análise fitoquímica foi realizada, através do ensaio sistemático fitoquímico, com o objetivo de se fazer uma triagem dos componentes fitoquímicos presentes na planta. Os dados obtidos corroboraram com as substâncias químicas posteriormente isoladas e identificadas, uma vez que foram encontrados um flavonóide e duas moléculas precursoras dos taninos hidrolisáveis classificados como elagitaninos. O flavonóide isolado tem uma estrutura bastante conhecida e estudada, trata-se da quercetina. As moléculas precursoras dos taninos hidrolisáveis foram identificadas como o ácido elágico e, seu derivado, o 3,3'-di-O-metil ácido elágico e, igualmente que a quercetina, são moléculas já conhecidas e estudadas.

Atividade antioxidante das frações e extratos foi analisada por três diferentes métodos. No método da inibição da peroxidação lipídica foram obtidos bons resultados para as amostras da folha e para a fração hexano da casca, que se mostraram superiores ao padrão BHT. A análise da inibição do radical DPPH não mostrou atividade antioxidante significativa para as frações em relação aos padrões rutina e vitamina C. A análise da formação do complexo fosfomolibdênico apresentou resultado significativo para a fração acetato de etila casca, que apresentou resultados estatisticamente iguais ao do padrão rutina.

A atividade tóxica das frações e extratos sobre o micro crustáceo *Artemia salina* foi testada para os extratos brutos de folhas e cascas e suas respectivas frações. Os extratos não apresentaram atividade tóxica contra os náuplios. Porém são necessários mais estudos de toxicidade, visto que a família Euphorbiaceae é conhecida por apresentar atividade tóxica.

A atividade hemolítica das frações e extratos foi testada por dois métodos e os resultados obtidos foram negativos, ou seja, os extratos não produziram hemólise. Este é mais um indício da baixa toxicidade da planta.

Sugere-se a realização de estudos pré-clínicos farmacológicos e toxicológicos com os extratos, para verificar as atividades compatíveis com a presença de taninos e flavonóides. Os extratos podem ser gastroprotetores, anti-

inflamatórios, antimicrobianos, entre outras atividades correlacionadas a estas duas classes de atividades. Assim, partindo-se de uma planta com poucos estudos e pouca utilização popular, pode-se, talvez, chegar à produção de um novo medicamento fitoterápico ou ao uso dos extratos em atividades industriais, como a conservação de alimentos.

Cientificamente os dados obtidos neste estudo são importantes para a produção de conhecimento sobre a flora brasileira e as espécies presentes no território brasileiro. O estudo é, também, importante para a Universidade, uma vez que esta produção de conhecimento se traduz em mais publicações. Finalmente, a sociedade é igualmente beneficiada, já que o conhecimento produzido pode, futuramente, trazer benefícios para a indústria e para a saúde pública.



## 6 REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA J. M.F.. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17(1), p. 114-140, Jan./Mar. 2007.

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C.. Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Interciencia**, v. 7, n. 7, 2002.

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications. **CRC Press**, New York, 2006.

ANVISA, **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – 6. ed.**, M7-A6, v..23, n. 2, 2003

ARBELAEZ, E. P. **Plantas utiles de Colombia**. 15. ed. Colômbia: Medellín, 1990.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira** 5. ed. v. 1/. Brasília: Anvisa, 2010.

BRAZ, R.F. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, Brasil, v. 33, n.1, p. 229-239, 2010.

BIANCO, E. M. **Química e potencial antioxidante de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macler. Caesalpiniacea**. 91 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Setor de Ciências de Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

CÁRCAMO, M. I.; CARRERE, R. **Curupí**. 2006.1 fotografia, color. Disponível em :<[http://www.rapaluruquay.org/organicos/articulos/especies\\_alternativas.html](http://www.rapaluruquay.org/organicos/articulos/especies_alternativas.html)>. Acesso em 11/04/2013.

CARVALHO J. L. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico de *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

CLAUS, E. P.; TYLER, V.E; BRADY, L.R. **Farmacognosy.** 6. ed., Lea & Febiger, p. 458-459, Philadelphia, 1970.

CONEGERO, L.S.; *ET AL.* Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (EUPHORBIACEAE). **Química Nova.** v. 26, n. 6, p. 825-827, 2003.

CORDEIRO, I.; SECCO, R.; PSCHIEDT, A.C. 2010. *Sapium* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB017664>>. Acesso em 03/05/2011.

COSTA, P. H. A. *ET AL.* Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. **Brazilian Journal Plant Physiology.** v.17, n. 4, p. 353-361, 2005.

CRONQUIST (1968). **Sistemática de Angiospermas do Brasil, Classificação Segundo Cronquist**, v. 2, 1984.

DEMARCO, D.; CASTRO M. M. **Glândulas foliares em *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax (Euphorbiaceae).** In: X CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP, 2002.

DEVIIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; POZETTI, G. L.. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Brasil, v. 6., p. 11-14, 2004.

DEVKOTA, H. P.; BASNET, P.; YAHARA, S.. Diterpene Esters and phenolic Compounds form *Sapium insigne* (ROYLE) BENTH. ex HOOK. fil.. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** v. 57, n. 11, p. 1289—1291, 2009.

DI STASI, L.C. *ET AL.* **Plantas Mediciniais na Amazônia e na Mata Atlântica.** 2. Ed. rev. ampl. São Paulo: UNESP, 2002.

EFING, L. M. A. C. **Compostos bioativos do material resinoso, subproduto do processamento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. –Hil.)**. 108f. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

EVANS, W. C., **Trease and Evan's Pharmacognosy**. 14. ed. Londres: Saunders, 1989.

FINNEY, D. J.; **Probit Analysis, A Statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve**. Cambridge :University Press, 1947.

FLACH J, KARNOPP C, CORÇÃO G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Sci Vet**. V. 33, n. 3, p. 291-296, 2005.

FUCK, S. B. *ET AL*. Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por moradores da área urbana de Bandeirantes, PR, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 3, p. 291-296, jul./set. 2005.

FUNARI, C.S.; FERRO, V. O.. Uso ético da biodiversidade Brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasil, v. 15, n.2, p. 178-182, 2005.

GRAHAM, J.G. *ET AL*. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 347-377, 2000.

HARUSAWA, S. *ET AL*. [3,3] Sigmatropic Ring Expansion of Cyclic Thionocarbonates. 13.1 Synthesis of Medium-Membered Heterocyclic Allenes and Synthetic Application to Antifungal Constituent of *Sapium Japonicum*. **Tetrahedron**, v. 51, n. 23, p. 6475-6494, 1995.

HARVEY, C. A.; HABER, W. A.. Remnant trees and the conservation of biodiversity in Costa Rican pastures. **Agroforestry Systems**, v. 44, p.37–68, 1999.

JACKSON, M.J. An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. **Proceedings of the Nutritional Society**, v.58, n. 4, p.673-676, 1999.

KALEGARI M.. **Composição fitoquímica e atividades biológicas de *Rourea induta* Planch, Connaraceae**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

KELLER, H. A. Colorant plants used by Guaranis of Misiones, Argentina. **Bonplandia**, v. 19, n. 1, p. 11-25, 2010.

KONEMAN, E. W. *ET AL.* **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. 2. ed. São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil Ltda, 1993.

LEE, S. *ET AL.* Hydrolysable Tannins From *Euphorbia thymipholia*. **Phytochemistry**, v.29, n. 11, p. 3621-3625, 1990.

LEWAN, L.; ANDERSON M.; MORALES-GOMEZ P.. The use of *Artemia salina* in toxicity test. **Alternat Lab Animals**, v. 20, p. 297-301, 1992.

LI, X. *ET AL.* NMR Assignments of ellagic acid derivates. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 37, p. 856-859, 1999.

LIMA, M.G.A. *ET AL.* Effect of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (DIPTERA, CULICIDAE) LARVAE. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. São Paulo, Brasil, v. 48, n. 4, p. 211-214, Jul/Ago., 2006.

LIU, J. *ET AL.* Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared with thiobarbituric acid. **Analytical Biochemistry** v. 245, p.161-166, 1997.

MACIEL, M. A. M. *ET AL.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, Brasil, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MEYER, B. N. *ET AL.* Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, p.31-34, 1982.

MIGUEL, O. G. **Ensaio Sistemático de Análise Fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MORAIS, S. M. *ET AL.* Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian Croton species. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, v.47, n.1, p.1-19, 1979.

OLIVEIRA, R.B; GIMENEZ, V. M. M.; GODOY, S.A.P. Intoxicações com espécies da família Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, Brasil, v.5, n. 1, p.69-71, jul., 2007.

PIETRZYCKA, A. *ET AL.* Effect of vita glucan on some antioxidant parameters of the human blood. In vitro study. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 63, n. 6, p. 547- 551, 2006.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

RICE, S.A.; MANESS, I.B. Brine Shrimp Bioassays: A Useful Technique in Biological Investigations. **The American Biology Teacher** v. 16, n. 3, p. 208-215, mar., 2004.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J.; KLEIN, R.M. **Flora Ilustrada Catarinense planejada e editada por Raulino Reitz: Euphorbiáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1988.

SOWEMIMO, A. *ET AL.* Cytotoxic activity of selected Nigerian plants. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines** v. 6, n. 4, p. 526 – 528, 2009.

SCHVARTSMAN, S. **Plantas venenosas**. São Paulo: Sarvier, p. 76-98, 1979.

SCHWIROWSKI, Paulo. **Flora de São Bento do Sul**. Disponível em <<http://sites.google.com/site/florasbs/euphorbiaceae/leiteiro>> (Acesso em 08/08/2011)

SILVA, C. H. T. P. *ET AL.* Antioxidant Capacity and Phenolic Content of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. and *Sapium glandulosum* (L.) Morong from Northeastern Brazil. **Molecules**. v. 16, p. 4728-4739, 2011.

SILVA, C. H. T. P. *et. al.* Phytochemical profile and antibacterial activity of bark and leaves of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. and *Sapium glandulosum* (L.) Morong. . **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 32, p. 4766-4771, aug, 2012.

SILVA, D. L. *ET AL.* Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* SW aqueous extract with anti-PLA<sub>2</sub> activity. **Toxicon**, v. 52, p. 655-666, 2008.

SILVA, H. R. *ET AL.* Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol. **Química Nova**, V. 30, n. 8, p. 1877-1881, 2007.

SIMÕES, M.C.O. *ET AL.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2000.

SOUZA, F.C.F. *ET AL.* Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Brasil: Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 4, p. 642-654, 2008.

SRIVASTAVA, S.; AGNIHOTRI V., 3-O-acemcycloart-23-en-25-ol from the roots of *Sapium*, **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 3, May7Jun,1985.

TROVÃO, D. M. B. M. *ET AL.* Estudo comparativo entre três fisionomias de caatinga no estado da Paraíba e análise do uso das espécies vegetais pelo homem nas áreas de estudo. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 2, 2004.

VALLE, L.S.; KAPLAN, M.A.C.. *Sapium glandulatum* COMPLEX (EUPHORBIACEAE). **Anais da Academia Brasileira de Ciências** Brasil, v. 72, n. 2, 2000.